

Neue Inhibitoren der Amyloid-Aggregation als potentielle Therapeutika der Alzheimerschen Erkrankung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Claudia Lengfelder

geboren am 28. November 1982
in München

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. PD Dr. Andreas Seeling, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Eugen Verspohl, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Tag der öffentlichen Verteidigung 25.02.2011

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2007 bis Dezember 2010 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. J. Lehmann für die Möglichkeit, an diesem spannenden Thema zu arbeiten, für die wertvollen fachlichen Diskussionen und besonders für seine freundliche und humorvolle Art, durch die immer eine angenehme Arbeitsatmosphäre herrschte.

Herrn PD Dr. A. Seeling danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates, die fachliche Unterstützung und die motivierenden Worte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen und Freunden für die schöne Zeit in Jena. Carolin Roegler danke ich für schöne Auszeiten vom Arbeitsleben, besonders an Karneval. Vor allem danke ich Robert A. Otto und Dina M. Robaa für die Vermittlung zwischen mir und meinem Computer und die lustige gemeinsame Zeit in unserem Büro, auf die ich immer voller Freude zurückblicken werde. Großer Dank gilt Juliane Pürstinger für die stets tatkräftige und hilfsbereite Unterstützung, wodurch selbst die stressige Endphase dieser Arbeit mit schönen Erinnerungen verbunden ist.

Den technischen Mitarbeitern des Institutes, besonders Heidi Traber und Katrin Fischer, danke ich für die Hilfsbereitschaft und nette Zusammenarbeit. Außerdem danke ich Inge Reich und Uwe Beck für die Bewältigung der alltäglichen Schwierigkeiten.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Bruder, meinen Eltern und meinen lieben Großeltern für Ihre Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken. Mein wohl größter Dank gilt jedoch meiner Oma, dafür dass sie immer für mich da war und ohne jeden Zweifel an mich geglaubt hat.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
A.1	Alzheimer-Krankheit	1
A.2	Risikofaktoren	1
A.3	Krankheitsbild der Alzheimer-Krankheit	2
A.4	Pathologische Veränderungen	3
A.4.1	Amyloid-Kaskaden-Hypothese	3
A.4.2	Neurofibrillenbündel	5
A.4.3	Cholesterol-Hypothese	6
A.5	Diagnostik	6
A.6	Therapie der Alzheimer-Krankheit	7
A.6.1	Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer)	8
A.6.2	Memantin	8
A.6.3	Unterstützende Therapiemaßnahmen	9
A.7	Statine als mögliche Therapeutika der Alzheimer-Krankheit	10
A.7.1	Biotransformation der Statine Lovastatin und Simvastatin	12
A.8	Organische Nitrate	13
A.8.1	Wirkmechanismus der NO-Donoren	14
A.8.2	NO-Donor-Hybridmoleküle	14
A.9	Neue Therapieansätze bei der Alzheimer-Erkrankung	14
A.9.1	Inhibition der direkten A β -Aggregation	16
A.10	Zielstellung der Arbeit	18
A.10.1	Synthese des Nitrat-Simvastatin-Hybrides (2)	19
A.10.2	Synthese verschiedener, an der lactonischen Hydroxylgruppe modifizierter Lovastatin- und Simvastatin-Derivate	19
A.10.3	Untersuchung der vasodilatorischen Eigenschaften der Hybridverbindungen	20

A.10.4	Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Statin-Derivaten auf die HMG-CoA-Reduktase.....	20
A.10.5	Etablierung eines Assays zur Untersuchung der direkten A β -Aggregation.....	20
A.10.6	Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Rifampicin und Clioquinol	20
B	Synthetischer Teil.....	21
B.1	Darstellung von Simvastatin als Synthesestrategie für die Nitrat-Statin-Hybride	
2 und 5	21
B.1.1	Literaturbekanntes zur Darstellung von Simvastatin (1) aus Lovastatin (3)	21
B.1.2	Syntheseplanung der Zielverbindungen 2 und 5	24
B.2	Nitratosäuren.....	26
B.2.1	Darstellung der 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (21)	26
B.2.2	Darstellung der 2-Nitrooxypropansäure (24).....	27
B.3	Umsetzung der Nitratosäuren mit dem Silylether 16 zu den Zielverbindungen	
2 und 5	27
B.3.1	Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten mit Dicyclohexylcarbodiimid als Acylierungsreagenz	28
B.3.2	Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten mit N-(3-Dimethyl-aminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid als Aktivierungsreagenz.....	29
B.3.3	Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten mit Carbodiimidazol als Aktivierungsreagenz	29
B.4	Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten über Nitratosäurechloride	30
B.4.1	Acylierung mit 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoylchlorid (33).....	30
B.4.2	Versuch zur Acylierung mit 2-Nitrooxypropanoylchlorid (34)	32
B.5	Weitere Statin-Derivate	33
B.5.1	Darstellung von Simvastatin (1)	33
B.5.2	Nitrat-Statin-Derivate	33
B.5.3	Anhydro-Simvastatin-Derivat (44) und Anhydro-Lovastatin-Derivat (45)	36
B.5.4	Acyl-Simvastatin- und Acyl-Lovastatin-Derivate	37
B.5.5	Versuch zur Darstellung eines Trifluoroacetyl-Lovastatin-Derivates (64).....	39
B.5.6	Versuch zur Darstellung von Tosyl-Statin-Derivaten.....	39

B.6	Darstellung eines Dinitrat-Simvastatin-Hybrides (74)	41
B.7	Darstellung eines Dipivaloyl-Statin-Derivates (75)	42
B.8	Darstellung eines 2,2-Dimethylbutanoyl-Diol-Derivates (76)	43
B.9	Relactonisierung von Atorvastatin-Calcium	44
B.10	Modifikationen an 5-Chlor-7-iod-8-chinolinol (Clioquinol, 79)	45
B.11	Modifikationen an 3-Hydroxy- γ -butyrolacton (82)	47
B.12	Überblick aller synthetisierten und pharmakologisch getesteten Statin-Derivate	48
C	Pharmakologischer Teil	49
C.1	Untersuchung zur Vasorelaxation an Koronararterien	49
C.1.1	Methodenbeschreibung	50
C.1.2	Ergebnisse und Diskussion	51
C.2	Untersuchung zur Inhibition der HMG-CoA-Reduktase	52
C.2.1	Methodenbeschreibung	53
C.2.2	Ergebnisse und Diskussion	55
C.3	β -Amyloid-Aggregation und deren Inhibition durch Statin-Derivate	58
C.3.1	Methodenbeschreibung	60
C.3.2	Ergebnisse und Diskussion	63
D	Zusammenfassung	81
D.1	Synthese des Nitrat-Simvastatin-Hybrides 2 und weiterer Nitrat-Statin-Hybride	81
D.2	Synthese verschiedener, an der lactonischen Hydroxylgruppe modifizierter Simvastatin- und Lovastatin-Derivate	82
D.3	Untersuchung der vasodilatorischen Eigenschaften der Hybrid-Verbindungen	83
D.4	Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Statin-Derivaten auf die HMG-CoA-Reduktase	83
D.5	Etablierung eines Assays zur Untersuchung der direkten A β -Aggregation	84
D.6	Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Rifampicin und Clioquinol	88
E	Abstract	90

F	Experimenteller Teil	92
F.1	Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten	92
F.2	Allgemeine Angaben zu Chemikalien.....	92
F.3	Synthesen	93
F.3.1	Nitrat-Statin-Hybride Allgemeine Arbeitsvorschrift1 (AAV 1).....	100
F.3.2	Anhydro-Simvastatin-undAnhydro-Lovastatin-Derivat - Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 2).....	103
F.3.3	Acyl-Simvastatin- und Acyl-Lovastatin-Derivate - Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 3)	105
F.3.4	Clioquinol-Derivate - Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 4).....	122
F.3.5	Butyrolacton-Derivat (84)	124
F.4	Untersuchungen der A β -Aggregation und deren direkten Inhibition.....	125
F.4.1	Allgemeine Angaben zu Materialien und Methoden.....	125
F.4.2	Versuchsdurchföhrung.....	125
G	Abkürzungsverzeichnis	127
H	Literaturverzeichnis	130
	Lebenslauf	141
	Eigenständigkeitserklärung	142

A Einleitung

A.1 Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimersche-Erkrankung (Alzheimer-Krankheit, Alzheimer's disease = AD) ist die bekannteste und häufigste Form der Demenz. Bei der AD kommt es zu irreversiblen, neurodegenerativen Prozessen, wodurch ein unaufhaltsamer Verlust der kognitiven Fähigkeiten hervorgerufen wird. Da die Alzheimer-Krankheit vorwiegend bei Menschen höheren Alters auftritt, gewinnt diese Erkrankung aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung in den industrialisierten Ländern immer mehr an Bedeutung. Schätzungen zur Folge leiden derzeit ca. 35 Millionen Patienten weltweit an der Alzheimer-Krankheit. Allein in Deutschland wird von



800000 Alzheimer-Erkrankten ausgegangen. Aufgrund der sich verändernden Altersstruktur könnte diese Zahl bis 2030 weltweit auf 60 Millionen ansteigen, sollte ein therapeutischer Durchbruch ausbleiben [Intq I; Intq II, Fillit, 2002; Wimo, 2010].

Angesichts der zunehmenden Zahl der Betroffenen ist eine intensive Erforschung von neuen medikamentösen Therapieoptionen wichtig. Zudem kann die Krankheit bis heute nicht geheilt werden, was abermals die Bedeutung neuer Behandlungsmöglichkeiten unterstreicht.

Abb.A-1 Alois Alzheimer (1864-1915) beschrieb die Alzheimer-Krankheit erstmals 1907.

A.2 Risikofaktoren

Der Alzheimer-Krankheit scheint eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde zu liegen, wobei das Alter den primären Risikofaktor darstellt. Des Weiteren wird beobachtet, dass vaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Diabetes Mellitus die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken erhöhen [Stozicka, 2007; Chirileanu, 2008].

Einen genetischen Risikofaktor stellt das Tragen einer bestimmten Form des Fettstoffwechsels für Apolipoprotein $\epsilon 4$ (Apo $\epsilon 4$) dar, welches eine aktive Rolle beim Transport von Cholesterol und anderen Fetten aus den Zellen heraus spielt. Erbträger von Apo $\epsilon 4$ weisen Polymorphismen auf Chromosom 19 auf und neigen zu einem erhöhten Cholesterolspiegel [Jarvik, 1995; Notkola, 1998]. Seit den frühen 1990er Jahren bestätigen immer mehr Studien einen direkten Zusammenhang zwischen einem erhöhten Cholesterolspiegel und der Ausbildung der Alzheimer-Krankheit [Shobab, 2005; Sjögren, 2006]. Auch konnte nachgewiesen werden, dass ein vermehrter Cholesteroltransport aus den Zellen das Auftreten von charakteristischen Merkmalen der AD begünstigt.

A.3 Krankheitsbild der Alzheimer-Krankheit

Erstmals wurde die Krankheit 1907 von dem Neuropathologen Dr. Alois Alzheimer (1864-1915; Abb.A-1) diagnostiziert. Seine 51-jährige Patientin Auguste D. zeigte ungewöhnliche Verhaltensstörungen, Orientierungslosigkeit, Stimmungsschwankungen sowie einen zunehmenden Abbau geistiger Fähigkeiten. Nach ihrem Tod ergaben Untersuchungen des Gehirns, dass beträchtliche Teile der Hirnrinde stark verändert waren und Eiweißablagerungen, verfilzte Faserbündel sowie tote Nervenzellen aufwiesen. Heute weiß man, dass die Alzheimer-Krankheit bei den Betroffenen aufgrund abnormer Akkumulation verschiedener Proteine im Gehirngewebe zu einem Abbau von Nervenzellen und der Degeneration der Hirnrinde führt [St. George-Hyslop, 2001; Burns, 2002, Reiss, 2005]. Eine „Kommunikation“ zwischen den Nervenzellen ist somit nicht mehr möglich.

Die Alzheimer-Krankheit entwickelt sich in einem allmählich fortschreitenden Prozess. Schon Jahre bevor erste Symptome wahrgenommen werden, hat das Gehirn eine andauernde irreversible Veränderung hinter sich (Abb.A-2). Auch wenn der individuelle Verlauf von Patient zu Patient verschieden ist, lässt sich das Krankheitsbild im Wesentlichen in drei Stadien unterteilen:

Die ersten Probleme mit dem Kurzzeitgedächtnis stellen sich im Schnitt schon einige Jahre vor der Diagnose „Alzheimer“ ein. Im Frühstadium, verstärken sich diese unspezifischen Symptome:



Die Fähigkeit, neue Informationen zu speichern geht verloren, jedoch erinnern sich Patienten an lang zurückliegende Ereignisse, als wären sie gestern gewesen. Darüber hinaus kommt es zu Konzentrationsschwächen, einer geringeren Belastbarkeit und Problemen mit der räumlichen Orientierung. Der Erkrankte hat Schwierigkeiten, sich in fremden Situationen zurechtzufinden. Nach und nach geht dies auch auf vertraute Situationen über.

Abb.A-2 Bildliche Darstellung der Schädigung und des langsamen Verfalls des Gehirns bei Alzheimer-Erkrankten [Intq III]

Im zweiten Stadium ist der weitere Verlauf durch immer stärker ausgeprägte Gedächtnis- und Orientierungsstörungen gekennzeichnet, wodurch sich die Krankheit kaum mehr ignorieren lässt. Es kommt zunehmend zu Unruhezuständen und Unsicherheiten in der Feinmotorik. Störungen des logischen Denk-, Sprach- und Urteilsvermögens prägen sich aus, bis hin zu einer vollständigen Wesensänderung mit Abnahme an emotionalen und sozialen Fähigkeiten. Im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung werden das Sprachvermögen und motorische Fähigkeiten, wie z. B. das Schlucken, mehr und mehr eingeschränkt. Den Betroffenen ist es kaum mehr möglich, am alltäglichen Leben teilzunehmen und Aktivitäten selbstständig zu bewältigen.

Im Endstadium bauen Bewusstsein und Muskulatur kontinuierlich ab. Der Patient wird bettlägerig, kraftlos und völlig pflegebedürftig. Elementare Bedürfnisse, wie Essen und Trinken, schwinden. Der körperliche Verfall und die Schädigung des Gehirns sind in dieser Phase so weit fortgeschritten, dass der Körper nicht mehr richtig kontrolliert werden kann. Viele Erkrankte versterben im Spätstadium an Sekundärleiden, wie einer Lungenentzündung oder einem Herzinfarkt.

A.4 Pathologische Veränderungen

Post mortem Untersuchungen von Alzheimer-Patienten zeigten, dass es zu einem beträchtlichen Verlust an Gehirnsubstanz (Abb.A-3) in dem Bereich kommt, welcher mit Lernen, Gedächtnis und emotionalem Verhalten assoziiert ist [St.George-Hyslop, 2001].

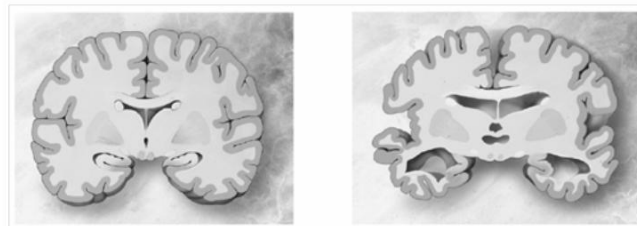


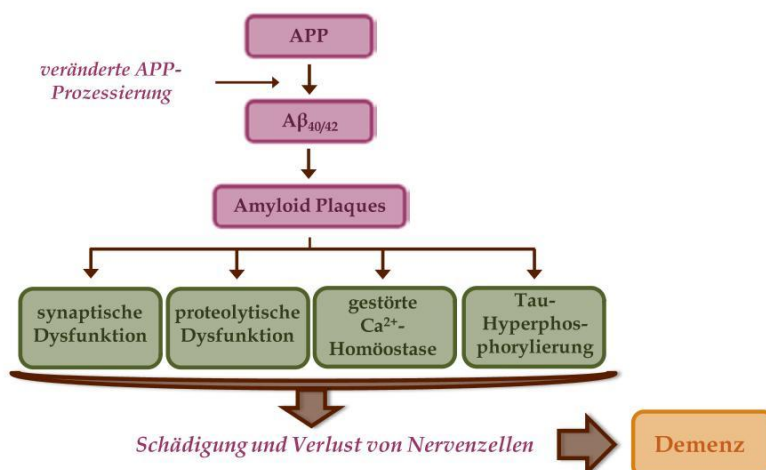
Abb.A-3 Darstellung des Gehirns einer gesunden Person (links) und des Gehirns einer Person, die schwer an Alzheimer erkrankt ist mit einer deutlich zu erkennenden degenerierten Hirnregion (rechts) [Intq IV]

Auffälligste neuropathologische Merkmale der degenerierten Hirnregionen sind die Entstehung von intrazellulären neurofibrillären Bündeln aus Tau-Protein [Kosik, 1986] und extrazellulär lokalisierten beta-Amyloidablagerungen ($A\beta$, senile Plaques) [Burns, 2002, Reiss, 2005].

Trotz jahrelanger intensiver Forschung ist die Pathoätiologie der Alzheimer-Krankheit bisher nicht bekannt, es wird aber eine Reihe von Hypothesen diskutiert.

A.4.1 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Nach der in den 1990er Jahren aufgestellten Amyloid-Kaskaden-Hypothese von Hardy und Higgins ist im ZNS gebildetes β -Amyloid ursächlich für die Neurodegeneration bei der Alzheimer-



Krankheit verantwortlich (Abb.A-4) [Hardy, 1992/2002]. Unter β -Amyloid versteht man jenes Peptid, welches durch proteolytische Spaltung des Amyloid - Precursor - Proteins (APP) entsteht [Selkoe, 1996].

Abb.A-4 Die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ (modifiziert nach [Intq V])

Obwohl diese Hypothese unter Forschern umstritten ist, gibt es zahlreiche Argumente für eine zentrale Rolle des A β in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit.

Im Rahmen der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wird die finale klinisch manifeste Demenz als Folge einer Reihe neurotoxischer Ereignisse, induziert durch die Freisetzung von β -Amyloid, beschrieben [Hardy, 1991]. Hierfür spielt die initiale Spaltung des APP eine entscheidende Rolle (Abb.A-5).

Das APP ist ein die Zellmembran durchquerendes Protein mit bis zu 770 Aminosäuren [Sisodia, 2002] und wird vor allem in Nervenzellen gebildet. Als integrales Membran-Protein vom Typ1 besitzt es eine transmembranäre Domäne mit einem langen extrazellulären N- und einem kurzen intrazellulären C-Terminus. Die proteolytische Spaltung von APP kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen: Dem nichtamyloidogenen und dem amyloidogenen Weg (Abb.A-5) [Vassar, 1999].

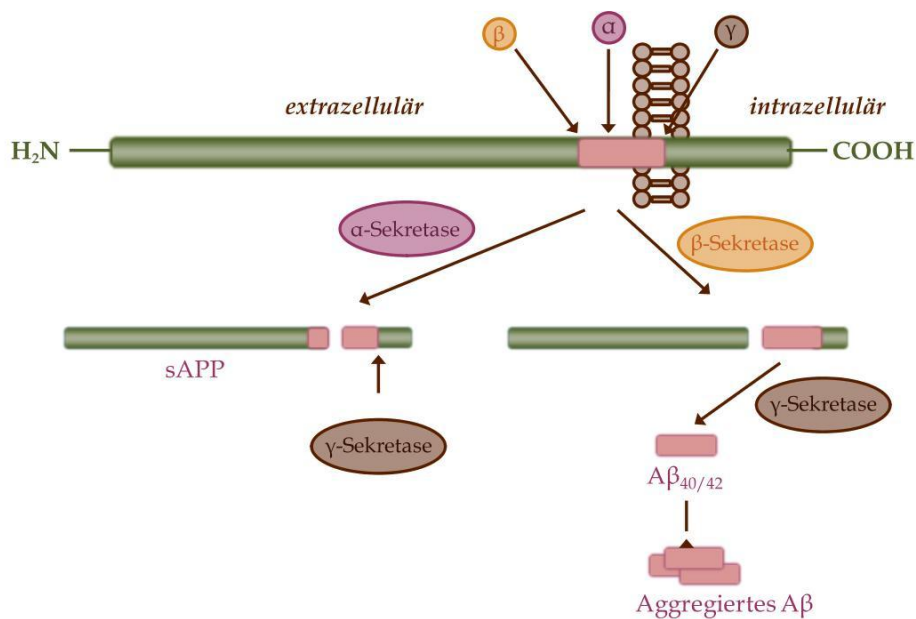


Abb.A-5 Darstellung der Prozessierung von APP durch die α -, β - und γ -Sekretase sowie der Freisetzung der A β -Fragmente 40 und 42, welche zur Aggregation neigen (modifiziert nach [LaFerla, 2002 und Postina, 2008]).

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Prozessierung des APP auf dem nichtamyloidogenen, α -sekretorischen Weg. Intrazellulär spalten α -Sekretasen das APP im Bereich des N-terminalen Endes (innerhalb der A β -Sequenz). Dabei entstehen als Spaltprodukte ein großes lösliches N-terminales sAPP α -Fragment und ein in der Membran verankertes, kleines C-terminales p3-CT-Fragment. Durch das Enzym γ -Sekretase erfolgt anschließend eine weitere Spaltung in die beiden löslichen, nicht pathogenen Abbauprodukte p3 und CT α [Esch, 1990; Gandy, 1999; Reid, 2007].

Bei der Alzheimer-Krankheit ist der Abbau von APP zugunsten des amyloiden β -sekretorischen Weges verschoben. Hierbei erfolgt im ersten Schritt eine Prozessierung durch die β -Sekretase (BACE-1 und BACE-2, APP- β -site cleaving enzyme) innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus des A β . Analog dem α -sekretorischen Weg entstehen das lösliche sAPP β -Fragment,

sowie das amyloide C-terminale A4-CT-Fragment. Durch die darauffolgende Spaltung mittels γ -Sekretase entstehen pathogene A β -Spezies unterschiedlicher Länge von 38 bis 43 Aminosäuren [Golde, 1992; Gandy, 1999; Mills, 1999]. Diese wandeln sich nach Verlassen der hydrophoben Membran in hydrophiler Umgebung von einer α -Helix-Struktur zu einer β -Faltblatt-Struktur um [Karkos, 2004]. Dies begünstigt eine Aggregation von A β -Monomeren zu Oligomeren, welche letztendlich unlösliche, fibrilläre Aggregate formen, die den Hauptbestandteil der charakteristischen extrazellulären senilen Plaques bilden (Abb.A-5) [Xu, 2005].

Nach Hardy und Higgins induziert das aggregierte A β die Bildung von Neurofibrillenbündeln aus dem Tau-Protein und stört den Calciumhaushalt, wodurch die intraneuronale Calcium-Konzentration stark ansteigt [Hardy, 1992]. Calciumionen spielen eine entscheidende Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. So kann eine erhöhte Calcium-Konzentration in der Zelle zu einer vermehrten Exzitotoxizität führen [LaFerla, 2002]. Nachfolgend konnte belegt werden, dass gebildetes β -Amyloid die Calcium-Homöostase tatsächlich beeinträchtigt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei der Alzheimer-Krankheit neben Entzündungsreaktionen [Akiyama, 2000] vermehrt freie Sauerstoffradikale durch die Ablagerung von Amyloidfibrillen gebildet werden [Butterfield, 2003/2004], welche zu Abnormalitäten im Lipidmetabolismus, mitochondrialen Dysfunktionen und einer Schädigung von DNS und Proteinen bis hin zum neuronalen Zelltod führen [Hensley, 1994; Behl, 1999].

A.4.2 Neurofibrillenbündel

Innerhalb der Nervenzellen zeigen sich neben den Amyloid-Plaques neurofibrilläre Bündel als zweites pathologisches Merkmal im Gehirn von Alzheimer-Patienten.

Größter Bestandteil der neurofibrillären Bündel ist das hyperphosphorylierte Tau-Protein [Grundke-Iqbal, 1986a+b]. Unter physiologischen Bedingungen unterstützt dieses Protein als Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts durch Bindung an die Mikrotubuli dessen Stabilisierung sowie den intrazellulären Transport verschiedener Signalmoleküle in die Axone [Paglini, 2000; Ballatore, 2007]. Durch den Grad der Phosphorylierung wird die Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau-Protein reguliert [Lindwall, 1984; Iqbal, 2005]. Infolge der Alzheimer-Krankheit kommt es jedoch zu einer krankhaften Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins. Daraus resultiert eine geschwächte Bindung des Tau-Proteins an die Mikrotubuli und damit eine Destabilisierung der axonalen Zytoskelettstruktur. Nicht gebundenes Tau-Protein aggregiert und lagert sich intrazellulär in Form neurofibrillärer Bündel ab. Folglich ist der Informationsfluss in den betroffenen Nervenbahnen behindert oder kommt ganz zum Erliegen, was neuronale Dysfunktionen und vermehrten Zelltod zur Folge hat [Goedert, 2005; Iqbal, 2005].

A.4.3 Cholesterol-Hypothese

Sparks *et al.* waren die Ersten, die eine „Cholesterol-Hypothese“ aufstellten und somit eine direkte Verbindung zwischen Störungen im Lipid- und Cholesterolfstoffwechsel und der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit untersuchten [Sparks, 1990]. Im Jahr 1993 wurde das APOE ϵ 4-Allel neben dem Alter als einer der primären Risikofaktoren identifiziert [Poirier, 1993].

Wharle *et al.* zeigten, dass die α -Sekretase in der Phospholipid-Region lokalisiert ist. Dahingegen befinden sich die β - und γ -Sekretase in den cholesterolreichen „*lipid rafts*“ der Zellmembran. [Wahrle, 2002; Cordy 2003]. Überschüssiges Membran-Cholesterol in den *lipid rafts* von Neuronen führt zu einer erhöhten amyloidogenen Spaltung von APP und somit zu einer unerwünschten Freisetzung von unlöslichen β -Amyloid-Fragmenten [Bodovitz, 1996; Wahrle, 2002]. Eine cholesterolreiche Umgebung bzw. das Verhältnis zwischen Phospholipiden und Cholesterol in der Zellmembran beeinflusst demnach die Aktivität der jeweiligen Sekretasen [Wolozin, 2001; Miller, 2004]. Durch die Hemmung der Cholesterol-Biosynthese können Statine die Membran-Cholesterol-Konzentrationen regulieren. In zahlreichen *in vitro* Studien wurde die Theorie von Sparks *et al.* bestätigt und der Einfluss von Cholesterol auf den A β -Stoffwechsel nachgewiesen: Durch Cholesterol-Anreicherung in kultivierten Neuronen wurden zum einen weniger lösliche α -sekretorische-Amyloid-Fragmente freigesetzt [Bodovitz, 1996; Galbete, 2000], zum anderen erfolgte die Prozessierung von APP größtenteils auf dem β -sekretorischen Weg unter Bildung von neurotoxischem β -Amyloid [Fears, 1999]. Im Gegensatz dazu vermindert eine Senkung der Cholesterol-Konzentration die A β -Freisetzung. [Buxbaum, 2001; Kojro, 2001]. Außerdem führte die Reduktion von zellulärem Cholesterol in Zellkulturstudien zu einer erhöhten Aktivität der α -Sekretase [Buxbaum, 2001] sowie zu einer verminderten γ -Sekretase-Aktivität. Auf diese Weise wird der nicht-amyloidogene α -Sekretase-Abbau von APP begünstigt. Fears *et al.* zeigten, dass Statine zudem auch die Aktivität der β -Sekretase deutlich mindern können [Fears, 1999].

Neuere Studien deuten darauf hin, dass die β - und γ -Sekretasen unabhängig voneinander durch zelluläre Cholesterol-Konzentrationen reguliert werden. Dies lässt vermuten, dass die enzymatische Aktivität der Sekretasen über unterschiedliche Mechanismen durch die Cholesterol-Konzentration reguliert wird [Grimm, 2008].

Diese Erkenntnisse führten zur Diskussion über die Relevanz von Cholesterol-synthesehemmern (Statinen) in der Alzheimer-Therapie [Jick, 2000].

A.5 Diagnostik

Häufig wird die Alzheimer-Krankheit erst im mittleren Stadium diagnostiziert, da sich ihre Pathogenese anfänglich schwer von normalen Alterungsprozessen unterscheiden lässt. Charakteristische Symptome werden meist erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt.

Durch das Fehlen krankheitsspezifischer Marker ist eine zuverlässige Diagnose im Frühstadium bis heute nur schwer möglich und wird hauptsächlich mit Hilfe neuropsychologischer Tests erstellt.

Interview-Testverfahren wie der im Jahr 1975 von Folstein entwickelte „Mini Mental Status Test“, ermöglichen eine Erstbeurteilung kognitiver Defizite von Patienten mit Gedächtnisstörungen und eine Beobachtung des Verlaufes, z. B. unter einer Therapie [Folstein, 1975]. Durch gezielte Fragen werden verschiedene Bereiche der Hirnleistung überprüft. Der Schweregrad der Demenz lässt sich mittels eines standardisierten Punktesystems einordnen. Zudem kann der Verlauf der Abnahme kognitiver Fähigkeiten bei den Betroffenen durch Wiederholung des Testes beurteilt werden.

Zusätzlich wird die „Alzheimer’s Disease Assessment Scale - cognitive subscale“ (ADAS-cog.) häufig als Richtlinie zur Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit möglicher Arzneistoffe bei klinischen Studien verwendet. Auf einer Skala von 0 bis 70 werden kognitive Leistungen des Gedächtnisses, Aufmerksamkeit und praktische Fähigkeiten, aber auch das Verhalten eingeordnet. So kann der Verlauf demenzieller Symptome beobachtet und erfasst werden [Rosen, 1984; Schultz, 2001].

Zudem werden in der neueren Diagnostik neben den laborchemischen Blutuntersuchungen auch bildgebende Verfahren, wie z. B. Magnetresonanztomographie (MRT) zur Vermessung des Hippocampusvolumens oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Darstellung des kortikalen Hypometabolismus, angewendet, um die Diagnose in einem früheren Stadium zu ermöglichen.

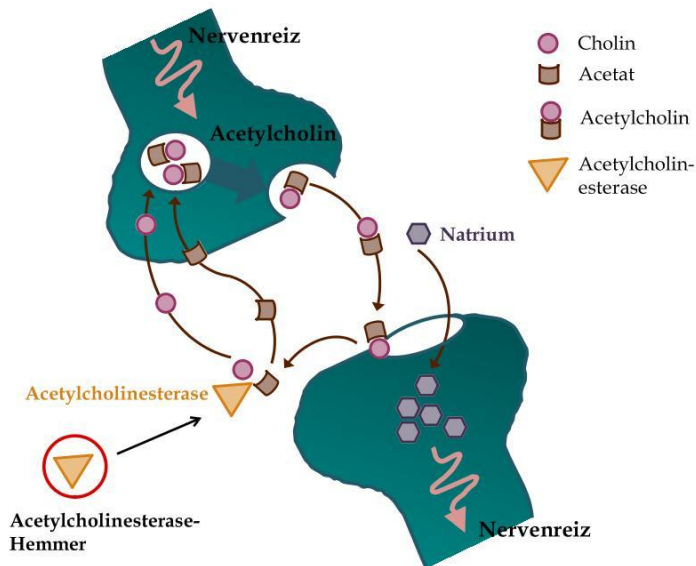
Ein letztendlicher Nachweis einer Alzheimer-Demenz ist dennoch, auch mit Hilfe dieser bildgebenden Verfahren, bis heute nach wie vor nur *post mortem* durch eine Gewebeanalyse im Rahmen einer Autopsie möglich.

A.6 Therapie der Alzheimer-Krankheit

Die Prävention oder Heilung der Alzheimer-Krankheit ist trotz intensiver Forschung bis heute nicht möglich, d. h. die fortschreitende Degeneration der Nervenzellen lässt sich nicht stoppen. Bisher zielen Therapieansätze lediglich darauf ab, den Krankheitsverlauf zu verlangsamen bzw. die Folge- und Begleiterscheinungen, die aus dem Absterben der Neuronen resultieren, zu unterdrücken und zu mildern [Wolfe, 2006; Upadhyaya, 2010]. Zur medikamentösen Behandlung der Symptome der Alzheimer-Krankheit stehen zwei Arzneimittelgruppen zur Verfügung, welche die gestörte Homöostase der Botenstoffe Glutamat und Acetylcholin positiv beeinflussen. Das Fortschreiten der Krankheit wird dadurch verzögert, so dass die Patienten im Allgemeinen geistig aktiver sind, wodurch sich die Lebenssituation der Betroffenen und Angehörigen deutlich verbessert.

A.6.1 Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer)

Die wohl älteste und am besten erforschte Gruppe an Arzneistoffen für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit sind die AChE-Hemmer, wie z. B. Donepezil und Rivastigmin. Sie gehören heutzutage zur Standardtherapie und verbessern den Signalaustausch zwischen den überlebenden Neuronen [Darvesh, 2003; Lleó, 2007].



Der cholinerge Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) wird in den präsynaptischen Nervenenden aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Cholin gebildet und in den Vesikeln der präsynaptischen Nervenenden bis zur Übermittlung von Nervensignalen gespeichert (Abb.A-6).

Abb.A-6 Darstellung der ACh-vermittelten Signaltransduktion zwischen cholinergen Neuronen und des Angriffspunktes für AChE-Hemmer (modifiziert nach [Leó, 2006])

Als einer der wichtigsten Botenstoffe des Gehirns ist ACh an vielen Prozessen beteiligt, die mit Denk- und Lernvorgängen sowie der Bewegung der Muskulatur verbunden sind [Hasselmo, 2006].

Bei Alzheimer-Patienten kommt es durch das Absterben der Nervenzellen zu einem Mangel an Acetylcholin und somit zu einer verminderten Signalübertragung [Ballard, 2002]. Durch die Hemmung der Acetylcholinesterase, welche im normalen Gehirnstoffwechsel das Acetylcholin abbaut (Abb.A-6), steht der Botenstoff länger zur Verfügung und die Signalübertragung an den Nervenzellkontakten wird verbessert [Lleó, 2006/2007].

A.6.2 Memantin

Neben dem cholinergen System ist bei Alzheimer-Patienten auch das glutaminerge Neurotransmittersystem gestört, wodurch es zu einer Überaktivität des Botenstoffes Glutamat kommt. Der Neurotransmitter Glutamat ist an der Steuerung von rund zwei Dritteln der Nervenzellen im Zentralnervensystem (ZNS) beteiligt. Er ist unter anderem verantwortlich für Gedächtnisleistung, Lernfähigkeit und Konzentration. Die Störung des Glutamathaushaltes führt bei Alzheimer-Patienten zu einer Dauerreizung der Nervenzellen. Durch die Erhöhung des Grundrauschens werden eine normale Signalwahrnehmung und somit auch die Signalweiterleitung verhindert (siehe Abb.A-7). Zusätzlich verlieren die Nervenzellen durch den

dauerhaft erhöhten intrazellulären Calcium-Spiegel ihre physiologische Funktion und gehen schließlich zu Grunde (Exzitotoxizität) [Michaelis, 1998].

Memantin blockieren die Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor. Durch die Blockade wird der kontinuierliche Fluss von Calcium in die Zelle unterbrochen (Abb.A-7). Das Grundrauschen normalisiert sich, wodurch Lernsignale wieder wahrgenommen werden [Reisberg, 2003; Robinson, 2006].

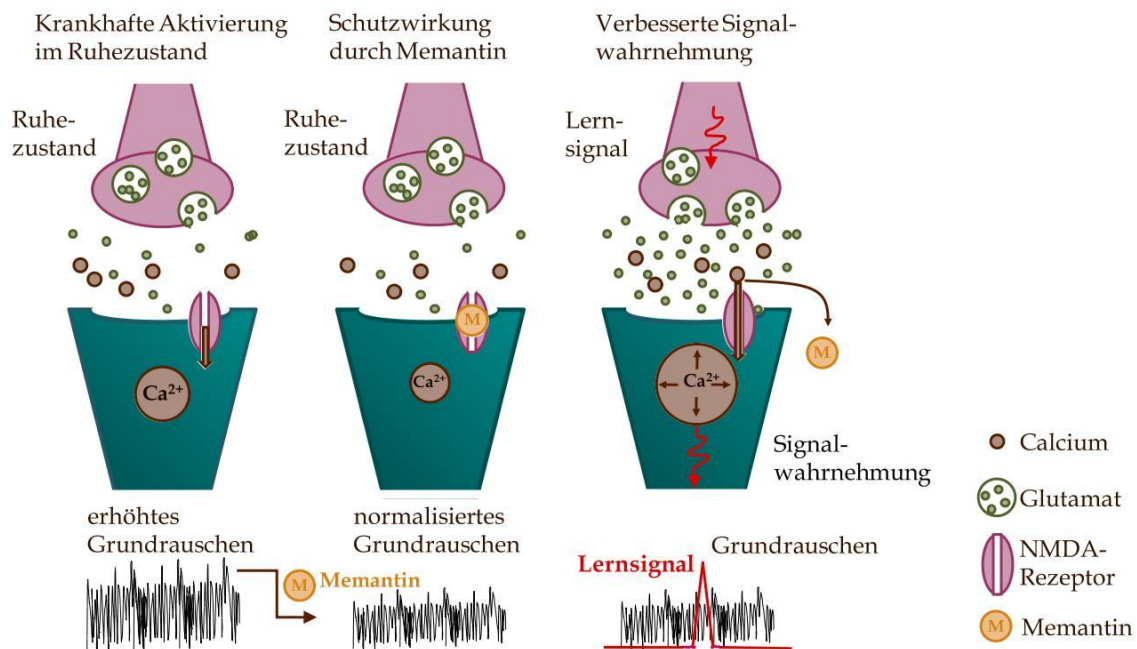


Abb.A-7 Wirkmechanismus von Memantin (modifiziert nach [Intq VI])

A.6.3 Unterstützende Therapiemaßnahmen

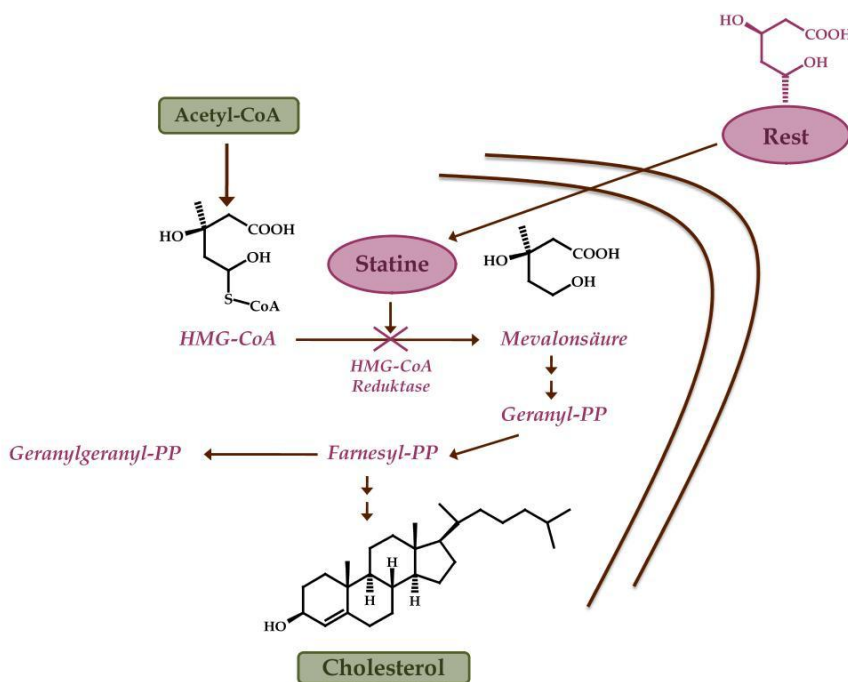
Unterstützend werden häufig auch Nootropika wie Piracetam und Ginkgo-biloba-Präparate verabreicht, die das Gehirn durch eine bessere Durchblutung u. a. verstärkt mit Sauerstoff und Glucose versorgen und somit die Gedächtnisleistung steigern sollen. Schließlich werden Antioxidantien, wie z. B. die Nahrungsergänzungsmittel Vitamin C und E, als Antidementiva angewandt. Aufgrund kontroverser Studienergebnisse ist die Wirkung solcher Substanzen jedoch umstritten [Höffler, 2004; Frank, 2005].

Die medikamentöse Behandlung von Alzheimer-Patienten wird oft durch eine psychologische Betreuung begleitet. Gegebenenfalls werden zusätzlich Psychopharmaka verabreicht, welche im Laufe der Krankheit auftretende Depressionen und Erregungszustände wie Aggressivität oder innere Unruhe mildern.

A.7 Statine als mögliche Therapeutika der Alzheimer-Krankheit

Statine werden insbesondere bei Hypercholesterinämie und zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Als erste Substanz dieser Klasse wurde Lovastatin ($C_{24}H_{36}O_5$) eingeführt, welches ursprünglich aufgrund der vermuteten antibiotischen Wirkaktivität aus dem Bodenpilz *Aspergillus terreus* extrahiert wurde [Alberts, 1980]. Biologisch aktiv ist die ringoffene Form der Verbindung mit β,δ -Dihydroxysäure-Struktur, die sich unmittelbar nach der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt durch enzymatische Hydrolyse des δ -Lacton-Ringes bildet [Moghadasian, 1999; Stark, 2003].

Statine sind Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase, welche die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure (Mevalonat) katalysiert und somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo* Cholesterol-Biosynthese darstellt (Abb.A-8) [Endo, 1992]. Die HMG-CoA-Reduktase wird von den Statinen reversibel und kompetitiv gehemmt, indem diese sich als falsche Substrate in



die Bindungstasche des Enzyms einlagern und es blockieren [Corsini, 1995; Stark, 2003]. Dies führt zu einem induzierten Mangel an intrazellulärem Cholesterol [Stancu, 2001], was sich, wie in Kap. A.4.3 erläutert, positiv auf die Konzentration an neurotoxischem A β auswirken kann.

Abb.A-8 Wirkmechanismus der Statine (modifiziert nach [Laufs, 2000, Intq VII]).

Die Cholesterol-Hypothese führte zudem zur Untersuchung der hemmenden Wirkung von Statinen auf die β -Amyloid-Aggregation. Lovastatin zeigte in einem Zell-Assay eine direkte Inhibition der A β -Aggregation von 35% [Gellermann, 2006]. Zu beachten ist allerdings, dass der dort eingesetzte Makrophagen-Zell-Assay nicht mit der humanen *in vivo* Situation gleichgesetzt werden kann. Bei der Durchführung des Assays wurde lösliches A β mit Monozyten inkubiert. Die sich dabei bildenden β -Amyloid-Plaques wurden mit Hilfe von Kongorot in einem Polarisationsmikroskop detektiert.

Tierversuche bestätigen, dass erhöhte Cholesterol-Konzentrationen die A β -Produktion fördern, während die Verabreichung von Statinen in einer verminderten A β -Freisetzung resultiert [Sparks, 1994/2000; Petanceska, 2002; George, 2004]. An Meerschweinchen konnte durch Statin-Gabe

eine signifikante Abnahme an β -Amyloid sowohl in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit als auch im Gehirn gezeigt werden [Fassbender, 2001].

Erste Ergebnisse epidemiologischer Studien unterstreichen den potentiellen Nutzen von Statinen in der Alzheimer-Therapie. So zeigt sich ein deutlich verringertes Auftreten der Alzheimer-Krankheit bei Patienten, die zuvor mit Statinen behandelt wurden [Jick, 2000; Wolozin, 2000; Hajjar, 2002].

Über die mögliche präventive Wirkung der Statine hinaus zeigten weitere Studien, gemessen an der Mini Mental Status Examination (MMSE), einen verminderten Abbau kognitiver Fähigkeiten und eine Tendenz zur Verbesserung der Symptomatik [Yaffe, 2002]. In einer Prospektivstudie wurden Patienten mit moderater Alzheimer-Demenz neben ihrer Basismedikation (Donepezil) zusätzlich mit Atorvastatin behandelt. Gemessen an dem ADAS-cog. zeigte jeder zweite Alzheimer-Kranke verbesserte kognitive Fähigkeiten [Sparks, 2005].

Vergleichbare Effekte blieben durch die Gabe anderer Lipidsenker aus. Dies deutete darauf hin, dass im Gehirn eher pleiotrope, cholesterinunabhängige Effekte der Statine für die neuroprotektive Wirkung relevant sind [Jick, 2000; Yaffe, 2002]. So wurde unter anderem gezeigt, dass Statine neben ihrer antiinflammatorischen und antioxidativen Wirkung die NO-Synthase im Endothel der Blutgefäße stimulieren und somit die Konzentration des Botenstoffes Stickstoffmonoxid erhöhen [Hess, 2000].

Des Weiteren lässt sich die Aktivierung der β -Sekretase an mehreren Stellen durch Statine beeinflussen, da diese sowohl über die Cholesterol- als auch die Isoprenoid-Biosynthese einen direkten Einfluss auf die β -Sekretase-Funktion ausüben können [Parson, 2006/2007].

Die β -Sekretase wird im Endoplasmatischen Retikulum gebildet und muss einige Umwandlungen erfahren, um in ihrer aktiven Form das APP spalten zu können [Parson, 2006]. Nach Anlagerung an die Zellmembran und anschließender Palmitoylierung entsteht das aktive Dimer der β -Sekretase. Darauf folgende Farnesylierung durch das isoprenoide Farnesyl-pyrophosphat stärkt die Bindung zur Zellmembran und ermöglicht das Einschleusen des aktiven Dimers in die cholesterolreichen *lipid rafts* der Zellmembran [Westmeyer, 2004; Schmechel, 2004], wo es seine pathogene Rolle in der APP-Prozessierung spielt. Somit führt eine verminderte Isoprenoid-Biosynthese zu einer Akkumulation von APP innerhalb der Zelle und zu einer verringerten Bildung und Freisetzung von pathologischem β -Amyloid [Parson, 2007]. Statine reduzieren die Farnesylierung der β -Sekretase [Ostrowski, 2007] und verschlechtern somit die Bindung zur Zellmembran.

Neben ihrem Einfluss auf die β -Sekretase zeigten Statine in Tiermodellen auch eine erhöhte Aktivität der α -Sekretase sowie eine verminderte Konzentration an extrazellulärem A β [Buxbaum, 2001]. Darüber hinaus wird durch den gesenkten Cholesterolspiegel eine Anreicherung an Cholesterol in den *lipid rafts* vermindert [Sjögren, 2006]. Auf diese Weise könnten Statine die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit positiv beeinflussen.

A.7.1 Biotransformation der Statine Lovastatin und Simvastatin

Lovastatin und Simvastatin sind Prodrugs, deren Lactonstruktur *in vivo* durch enzymatische Hydrolyse gespalten wird, wodurch die entsprechend wirksame Dihydroxyheptansäure erhalten wird [Stark, 2003].

Die darauf folgende hepatische Metabolisierung findet weitestgehend durch Cytochrom-P-Enzyme (CYP) der Subfamilie 3A statt, welche in der Leber und der Darmwand exprimiert werden [Wang, 1991; Guengerich, 1999]. Für die Verstoffwechselung der Statine sind im Wesentlichen drei Isoenzyme verantwortlich: CYP3A4, CYP2C9 und CYP2D6.

Bei Lovastatin führt der Hauptmetabolisierungsweg über die 6'-Position zu den drei aktiven Metaboliten 6'- β -Hydroxy-Lovastatin (Hauptmetabolit), 6'-Exomethylen-Lovastatin und, in

geringerem Umfang, zu 3''-Hydroxy-Lovastatin (Abb.A-9) [Wang, 1991]. Zusätzlich wird Lovastatin in geringem Maße durch Hydroxylierung in 3''-Position und Oxidation in β' -Position in ein Pentansäure-Derivat überführt, welches weiter zu einem Taurin-Konjugat reagiert [Vyas, 1990].

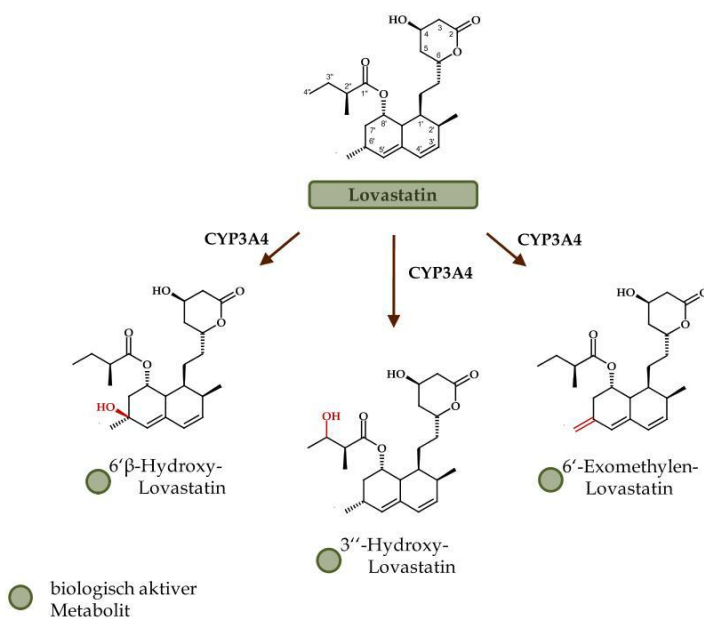


Abb.A-9 Metabolismus von Lovastatin (modifiziert nach [Wang, 1991; Ritter, 2003])

Die Metabolisierung von Simvastatin verläuft analog der des Lovastatin primär an der 6'-Position

über bisher zum Teil noch nicht identifizierte CYP-Enzyme [Christians, 1998]. In Studien konnten mehr als zehn unterschiedliche, den Lovastatin-Metaboliten strukturell ähnliche Abbauprodukte isoliert werden.

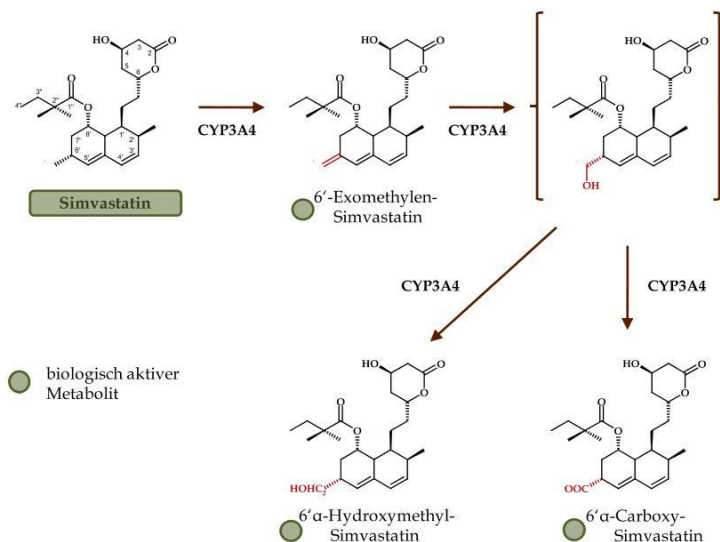


Abb.A-10 Metabolismus von Simvastatin (modifiziert nach [Cheng, 1994; Vickers, 1991, Ritter, 2003])

Als Hauptmetabolite wurden 6' α -Carboxy-Simvastatin und 6' α -Hydroxymethyl-Simvastatin identifiziert, wobei angenommen wird, dass die Bildung über den Metaboliten 6'-Exomethylen-Simvastatin verläuft (Abb.A-10) [Vickers, 1991; Ritter, 2003].

A.8 Organische Nitrate

Stickstoffmonoxid (NO) gewann an großer Bedeutung, als es in den frühen 1980er Jahren von Furchgott, Murad und Ignarro als EDRF ("*endothelium derived relaxing factor*") identifiziert wurde [Ignarro, 1987/1989]. Durch eine NO-vermittelte Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (*soluble guanylyl cyclase*, sGC) kommt es zur Erhöhung des *second messenger* Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP) und einer damit verbundenen Gefäßrelaxation [Thatcher, 2005]. Im Körper kann NO von drei unterschiedlichen NO-Synthasen (NOS) durch Desaminierung von L-Arginin gebildet werden, von der neuronalen nNOS, welche in Nervenzellen aktiv ist, der induzierbaren iNOS, welche in den Makrophagen lokalisiert ist, und der endothelialen eNOS, welche im Endothel NO bildet [Bandarage, 2001].

NO ist ein wichtiges Signalmolekül im menschlichen Körper und spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine Rolle. Besonders bei der kardiovaskulären Regulation, der Kommunikation der Nervenzellen, wie sie z. B. bei Lernprozessen stattfindet [Brunner, 2005; Thatcher, 2006], und der Abwehr von eindringenden Organismen ist es von Bedeutung [Brunelli, 2007]. Über die lang bekannte relaxierende Wirkung auf die Gefäßmuskeln zur Regulation von Blutfluss und Blutdruck hinaus weiß man heute auch, dass NO an einer Vielzahl neuroprotektiver Wirkmechanismen beteiligt ist [Lipton, 1993; Brunner, 2005]. Bisher ist die Rolle von NO bei neuroprotektiven Erkrankungen, wie z. B. der Alzheimer-Krankheit, allerdings noch sehr umstritten. Sehr widersprüchliche Ergebnisse findet man im Bezug auf die Veränderung bzw. Fehlfunktion der NO-Signaltransduktion in Folge einer Demenz. Es wird beschrieben, dass es zur vermehrten Freisetzung von NO und einer damit einhergehenden Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt [Eliasson, 1999]. Aufgrund ihrer Reaktivität können diese mit verschiedenen zellulären Komponenten, wie DNA, Membranlipiden oder Proteinen, reagieren und Schädigungen im Organismus bzw. einen neuronalen Untergang hervorrufen [Beckmann, 1994]. Dies steht im Widerspruch zu den oben beschriebenen Ansätzen, welche einen möglichen Mangel an NO und bzw. oder eine Minderung der biologischen Aktivität von NO und der Herabsetzung der NO/cGMP-Signaltransduktion als Folge einer neurodegenerativen Erkrankung annehmen [Keeble, 2002]. Durch Wirkstoffe, die NO freisetzen, sollen antiinflammatorische und antioxidative Effekte verbessert und die Neurodegeneration sowie das Fortschreiten der Pathogenese verhindert werden [Thatcher, 2005; Fang, 2008b].

Darüber hinaus könnte durch vaskuläres NO eine bessere Durchblutung des Gehirnes [Fang, 2008b] und eine damit verbundene erhöhte Nährstoffversorgung hervorgerufen werden.

A.8.1 Wirkmechanismus der NO-Donoren

NO-Donoren sind Moleküle, aus denen NO freigesetzt werden kann, also chemische Quellen für Stickstoffmonoxid (NO). Bis heute konnte nicht vollständig geklärt werden, ob sie ausschließlich NO freisetzen oder auch andere NO-äquivalente Stickstoffverbindungen gebildet werden. Allerdings sind die organischen Nitrate im Gegensatz zu direkten NO-Donoren wie z. B. Diazeniumdiolaten, an eine vorausgehende reduktive Bioaktivierung gebunden.

Organische Nitrate aktivieren wie NO die lösliche Guanylylzyklase (sGC), welche die Umsetzung von Guanosin-5-triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3'-5'-monophosphat (cGMP) katalysiert [Thatcher, 2006]. cGMP ist ein *second messenger* und reguliert wichtige biochemische Abläufe in Blutgefäßen und im ZNS [Wang, 1997]. So ist die NO/sGC/cGMP-Signaltransduktion wichtig bei der Modulation synaptischer Transmission und Plastizität verschiedener Hirnregionen, wie dem Hippocampus, welche wichtig für Lernprozesse und Gedächtnisbildung sind [Son, 1998; Lu, 1999].

Des Weiteren gibt es Belege, dass NO-Donoren auf einem cGMP-unabhängigen, bis jetzt noch nicht vollständig geklärten Weg positive Effekte auf kognitive Prozesse ausüben [Thatcher, 2005].

A.8.2 NO-Donor-Hybridmoleküle

Ziel von NO-Donor-Hybridverbindungen ist es, die biologische Aktivität einer Leitstruktur aufrecht zu erhalten und dieser durch die Einführung eines organischen Nitrat-Restes eine zweite bioaktive, die NO/sGC/cGMP-Signaltransduktion regulierende Struktur im Molekül zur Seite zu stellen [Thatcher, 2005]. Demnach stellen NO-Donor-Hybride Verbindungen dar, welche eine oder mehrere NO-liefernde Gruppen, wie sie z. B. in einem organischen Nitrat zu finden sind, mit einer anderen pharmakophoren Gruppe im Molekül vereinen [Bandarage, 2000; Fang, 2008a].

Ein Mangel an NO bzw. eine Minderung der biologischen Aktivität von NO tritt speziell im Zusammenhang mit kardiovaskulären, aber auch inflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen auf [Keeble, 2002]. Das Applizieren von NO durch die Gabe von NO-Donoren scheint daher von therapeutischem Nutzen zu sein. Aus diesem Grund gewinnen NO-Hybridstrukturen immer stärker an Bedeutung und werden auch im Rahmen der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen entwickelt und untersucht [Thatcher 2005/2006; Fang, 2008b].

A.9 Neue Therapieansätze bei der Alzheimer-Erkrankung

Trotz jahrelanger intensiver Forschung ist es bisher noch nicht gelungen, den zentralen Ausgangspunkt zu identifizieren und das Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit vollständig zu verstehen. Mit der Hoffnung, den schleichenden Nervenzelluntergang zu verlangsamen oder gar aufzuhalten, beschäftigen sich Therapieansätze mit verschiedenen Wirkprinzipien.

Weitgehend akzeptiert ist, dass die Ablagerung von β -Amyloid eine zentrale Rolle in der Alzheimer-Pathogenese spielt. Neue Behandlungsstrategien setzen, basierend auf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese, überwiegend an dem Amyloid-Protein-Stoffwechsel an:

Ein Ansatz der Forschung ist hierbei, die eigentliche Produktion und Freisetzung von $A\beta$ zu vermindern. Durch Inhibition der β - und γ -Sekretasen sollen jene Enzyme gehemmt werden, die bei Alzheimer-Kranken den ungünstigen Abbau des APP zum Plaque-bildenden monomeren β -Amyloid katalysieren. So zeigte Tarenflurbil (R-(-)-Flurbiprofen) als erster γ -Sekretase-Hemmer eine Minderung der γ -Sekretase-Aktivität und eine damit verbundene Senkung der Produktion sowie Sekretion von $A\beta$. Allerdings konnten diese Ergebnisse in Phase II- und Phase III-Studien nicht bestätigt werden [Wilcock, 2008; Rafii, 2009]. Derzeit wird eine „zweite Generation“ an γ -Sekretase-Hemmern in verschiedenen Studien untersucht. Jedoch bleibt die klinische Anwendung fraglich, da die γ -Sekretase neben dem APP die Funktion vieler anderer Proteine beeinflusst, wodurch zytotoxische Effekte, z. B. durch eine verhinderte NOTCH-Spaltung, nicht ausgeschlossen werden können [Wolfe, 2008]. Vielversprechend erscheinen weiterhin Hemmstoffe der β -Sekretase, welche neben einer verminderten Aktivität der β -Sekretase zu einer erhöhten Aktivität der α -Sekretase führten [Sankaranarayanan, 2008].

Auch gibt es verschiedene Forschungsansätze, die sich auf die Aktivierung der α -Sekretase konzentrieren, um das Gleichgewicht auf die Seite der nichtamyloiden Produkte zu verschieben.

Sowohl eine aktive als auch eine passive Immunisierung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen β -Amyloid soll das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen und die Bildung neuritischer Plaques verhindern. Zudem sollen bereits gebildete Aggregate im Gehirn durch aktive Immunisierung abgebaut werden, was Schenk *et al.* in einem Tiermodell bestätigen konnten [Schenk, 1999]. Jedoch mussten klinische Studien wegen schwerer und z. T. tödlicher Nebenwirkungen abgebrochen werden [Schenk, 2002; Lemere, 2010]. Zurzeit befinden sich einige „zweite Generation“ Impfstoffe zur aktiven und passiven Immuntherapie in klinischen Studien [Jicha, 2009; Lemere, 2010].

Weitere neue Strategien zielen darauf, in den Tau-Protein-Stoffwechsel einzugreifen und eine Verklumpung von Tau zu verhindern [Citron, 2004]. Durch Hemmung der Phosphatasen soll die Hyperphosphorylierung und die damit verbundene Bildung intrazellulärer Neurofibrillen inhibiert werden. Derzeit werden Inhibitoren der Tau-Phosphorylierung in vorklinischen Studien getestet. Darüber hinaus werden die Tau-Aggregationshemmung und die Desaggregation von Ablagerungen sowie eine Tau-Immuntherapie untersucht [Iqbal, 2007; Schneider, 2008].

Große Hoffnung wird auch in Fibrillisations-Inhibitoren gesetzt, welche direkt mit dem bereits gebildeten β -Amyloid oder mit dessen aggregationsfördernden Substanzen interagieren sollen, um so eine Zusammenlagerung von monomerem β -Amyloid zu blockieren und die Plaque-Bildung zu verhindern.

A.9.1 Inhibition der direkten A β -Aggregation

Derzeit werden einige niedermolekulare Substanzen und Arzneistoffe hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Aggregation von β -Amyloid zu hemmen, untersucht. Zu den in der Literatur beschriebenen Verbindungen gehören unter Anderem: Kongorot, Clioquinol, Melatonin, Nicotin, Rifampicin, Tramiprosat und Polyphenole. Erste vielversprechende klinische Studien lassen darauf hoffen, dass aggregationsinduzierte synaptische Dysfunktionen und Neurotoxizität durch Aggregationsinhibitoren in Zukunft möglicherweise reduziert werden können [Hamaguchi, 2006; Christensen, 2007].

Viele der getesteten Substanzen zeigen einen aromatischen Anteil und einen hydrophoben Charakter, unterscheiden sich jedoch in ihren Strukturen [Hamaguchi, 2006; Christensen, 2007]. Es wird angenommen, dass sie einen unterschiedlichen Wirkmechanismus besitzen und die Aggregation in unterschiedlichen Phasen beeinträchtigen. So haben z. B. Salomon *et al.* in ihrer Studie gezeigt, dass Nicotin die Fibrillenausbildung möglicherweise durch eine Stabilisierung der Helix-Struktur von A β verhindert. Ono *et al.* berichteten sogar von einem Abbau bereits gebildeter Fibrillen durch Nicotin *in vitro* [Salomon, 1996; Ono, 2002].

Wie bereits erwähnt, ist eine andere Strategie, die Inhibition bestimmter Mediatoren, von denen angenommen wird, dass sie die Fibrillenbildung fördern, wie z. B. Glycosaminoglycan (GAG). Tramiprosat, eine 3-Amino-1-propansulfonsäure, wurde speziell dafür entwickelt, um als „GAG-Konkurrent“ an monomeres A β zu binden und dessen Aggregation zu blockieren [Melnikova, 2006; Christensen, 2007]. In einer Phase II Studie waren die Resultate vielversprechend [Aisen, 2006], was jedoch nicht in klinischen Studien der Phase III bestätigt werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tramiprosat eine erhöhte Aggregation von Tau fördert [Santa-Maria, 2007].

Metallionen, wie z. B. Kupfer (Cu²⁺) und Zink (Zn²⁺), reichern sich *in vivo* verstärkt in Amyloid-Plaques an [Atwood, 1998]. *In vitro* erfolgt durch den Zusatz beider Metallionen eine rasche, geförderte Aggregation des A β , jedoch konnte dieser Effekt für Cu²⁺ nur unter leicht aziden Bedingungen beobachtet werden [Atwood, 1998]. Demnach bildet die Chelatierung von Zn²⁺ und Cu²⁺ einen weiteren Therapieansatz [Bush, 1994/2008]. Durch das Abfangen und einer dadurch verminderten Konzentration dieser Ionen im Gehirn soll die Fibrillen- und Plaque-Bildung reduziert werden. Tatsächlich zeigten einige Chelatbildner *in vitro* sowohl eine Verminderung der Zn²⁺- bzw. Cu²⁺-induzierten Aggregation als auch einen Abbau bereits gebildeter Aggregate in dem Gehirn. Das vom Markt genommene Antibiotikum Clioquinol, welches durch seinen lipophilen Charakter ungehindert die Blut-Hirn-Schranke passieren kann [Gouras, 2001], komplexiert Zn²⁺- und Cu²⁺-Ionen mit einer hohen Affinität [Bush, 1994; Cherny, 2001]. Cherny *et al.* zeigten, dass Clioquinol *in vitro* und *in vivo* in der Lage ist, Alzheimer-Plaques aufzulösen und in Tierstudien die Ablagerung von β -Amyloid um 49% zu senken [Cherny, 2001]. Clioquinol konnte in einer Phase II Studie eine Verbesserung kognitiver Fähigkeiten bewirken und führte zu einer signifikanten Herabsetzung der A β -Plasma-Konzentration bei Alzheimer-Patienten

[Ritchie, 2003]. Aufgrund starker Nebenwirkungen wie subakuter myelo-optischer Neuropathien (SMON) wurde Clioquinol jedoch zurückgezogen [Cherny, 2001; Chang, 2009].

Auch deuteten in den letzten Jahren zahlreiche *in vitro* Studien darauf hin, dass eine Vielzahl natürlich vorkommender Polyphenole möglicherweise einen aggregationshemmenden Effekt auf bereits gebildetes β -Amyloid ausüben könnte. Außerdem konnte für verschiedene Polyphenole eine konzentrationsabhängige Destabilisierung bereits gebildeter Aggregate nachgewiesen werden [Ono, 2003].

Mittels eines Aggregations-Assays konnte unter Verwendung des A β -Fibrillen-Markers Thioflavin T und elektronenmikroskopischer Aufnahmen *in vitro* gezeigt werden, dass das Antibiotikum Rifampicin mit β -Amyloid interferiert und in Folge dessen die Bildung von Fibrillen vermindert. Sowohl durch eine konzentrationsabhängige Aggregationshemmung von β -Amyloid als auch durch konzentrationsabhängiges Abfangen von frei werdenden Hydroxyl-Radikalen konnte eine Minderung der Neurotoxizität erzielt werden. Untersuchungen verschiedener Oxidationsprodukte und Rifampicin-Derivate identifizierten das Naphthohydrochinon-Grundgerüst als aktives Zentrum für die aggregationshemmende Wirkung des Antibiotikums [Tomiyama, 1994/1996].

Eine klinische Kontroll-Studie von Loeb *et al.* bestätigte diese Befunde. Gemessen anhand der ADAS-cog. wurde nach sechs Monaten ein deutlich verminderter kognitiver Abbau in der Gruppe der Rifampicin-Patienten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Placebo) beobachtet. Nach zwölf Monaten näherte sich der kognitive Abbau beider Gruppen an, und es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Allerdings zeigte das „Standardized Mini-Mental Status Exam Score“ eine signifikant geringere Verschlechterung. Ebenfalls waren Begleitsymptome der Alzheimer-Krankheit, wie funktionaler Status, Depressionen und dysfunktionales Verhalten, drei Monate nach Studienbeginn in der Gruppe der Rifampicin-Patienten deutlich vermindert [Loeb, 2004].

A.10 Zielstellung der Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, hemmen Statine die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, die das Schlüsselenzym der Cholesterol-Biosynthese darstellt (vgl. Kap A.7). Neben dem Altern und genetischen Veränderungen gilt ein erhöhter Cholesterolspiegel als weiterer Risikofaktor der Alzheimer-Krankheit. Infolgedessen wurden Statine in den letzten Jahren vermehrt auf ihre positiven Effekte bei dieser Erkrankung untersucht. Bisher konnte ihr genauer Wirkmechanismus jedoch nicht vollständig geklärt werden. Bekannt ist allerdings, dass Membran-gebundenes Cholesterol die Aktivität der an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen beeinflusst und somit die Bildung und Freisetzung von β -Amyloid moduliert. Darüber hinaus werden in der Literatur andere, nicht von Statinen abgeleitete, NO-freisetzende Hybrid-Verbindungen als mögliche Alzheimer-Therapeutika diskutiert [Thatcher 2005/2006; Fang, 2008b].

Mit der Hoffnung, durch die Verknüpfung zweier für die Alzheimer-Therapie aussichtsreicher Pharmakophore einen synergistischen Effekt zu erzielen, sollte zunächst ein nitrooxyliertes Simvastatin-Derivat (**2**) synthetisiert werden. Hierbei galt es den Nitrat-Rest möglichst ohne „spacer“ an die Grundstruktur zu knüpfen. Auf diese Weise kann dem Simvastatin eine zweite bioaktive, die NO/sGC/cGMP-Signaltransduktion regulierende, Struktur im Molekül zur Seite gestellt werden, ohne den Statin-typischen Wirkmechanismus durch strukturelle Veränderungen zu sehr zu beeinflussen (Abb.A-11).

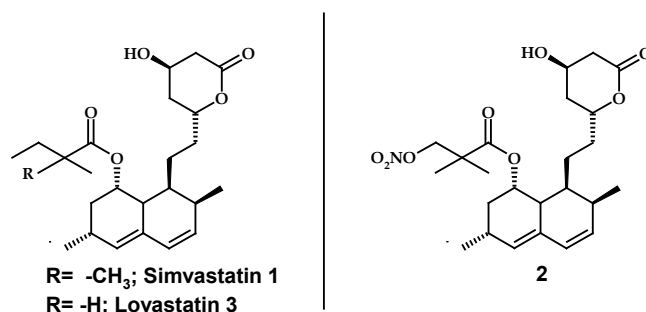


Abb.A-11 Zielstruktur Nitrat-Simvastatin-Derivat **2**

Besonders galt es zu untersuchen, ob die charakteristischen cholesterolsenkenden und vasodilatorischen Wirkungen beider Pharmakophore in den Hybridverbindungen erhalten bleiben.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten einige kommerziell erhältliche Statine und das neuartige Nitrat-Simvastatin-Derivat (**2**) auf die für Statine wenig erforschte β -Amyloid-aggregationshemmende Wirkung untersucht werden. Hierzu sollte zunächst ein geeigneter β -Amyloid-Assay etabliert werden.

In der Hoffnung, bereits bei der ersten Zielverbindung eine signifikante anti-aggregative Wirkung zu erzielen, sollten dann weitere, auch für die Substanzklasse der Statine strukturell eher untypische Modifikationen vorgenommen werden. Neben der aggregationshemmenden Wirkung

sollten die erhaltenen Statin-Derivate der in Abb.A-12 dargestellten allgemeinen Formel **4** ebenfalls bezüglich ihrer Aktivität auf die HMG-CoA-Reduktase untersucht werden.

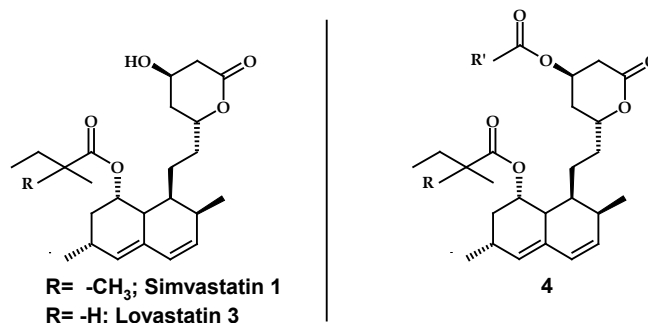


Abb.A-12 Statin-Derivate der allgemeinen Struktur **4**, wobei $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3$; $\text{R}' = \text{Acyl}, \text{Nitrooxyacyl}, \text{Tosyl}$

Nachfolgend sind die Ziele der Arbeit detaillierter aufgeführt:

A.10.1 Synthese des Nitrat-Simvastatin-Hybrides (2)

Bereits in früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises wurden Nitrat-Hybrid-Verbindungen, wie z. B. NO-NSAIDs und NO- β -Blocker, synthetisiert und pharmakologisch untersucht. In Fortsetzung dieser Strategie sollten nun weitere neue Hybrid-Verbindungen konzipiert und dargestellt werden, wobei die strukturelle Ähnlichkeit der ersten Zielverbindung mit der „Grundstruktur“ des Simvastatins gewährleistet sein sollte, wie auch aus Abb.A-11 deutlich wird. So könnte die pharmakologische Aktivität des Simvastatins durch den fehlenden *spacer* zur Nitratfunktion weitgehend unbeeinflusst bleiben und das NO-liberierende Nitrat einen zusätzlichen Effekt induzieren.

A.10.2 Synthese verschiedener, an der lactonischen Hydroxylgruppe modifizierter Lovastatin- und Simvastatin-Derivate

Gellermann *et al.* zeigten für Lovastatin eine leichte Inhibition der β -Amyloid-Aggregation [Gellermann, 2006]. Bisher ließ sich jedoch nicht klären, welche Strukturelemente dieses Statins für den Effekt von Bedeutung sind und ob strukturelle Variationen das inhibitorische Potential nicht noch verbessern könnten. Entsprechend galt es, Statin-untypische Modifikationen an der Hydroxylgruppe verschiedener Statine synthetisch zu realisieren und die direkte Inhibition der β -Amyloid-Aggregation für diese neuen Verbindungen der allgemeinen Struktur **4** zu untersuchen. Insbesondere durch Variation der Acylreste in **4** und folgenden pharmakologischen Untersuchungen könnte deutlich hervorgehen, welche strukturellen Moleküleigenschaften für etwaige inhibitorische Effekte verantwortlich sind. Ferner sollte überprüft werden, ob die organische Nitrat-Gruppe einen verstärkenden Effekt auf die Hemmung der β -Amyloid-Aggregation ausübt.

A.10.3 Untersuchung der vasodilatorischen Eigenschaften der Hybridverbindungen

Da die angestrebte Wirkung der Hybridverbindungen z. T. auch auf einer Freisetzung von NO oder NO-äquivalenten Spezies beruht, sollte in Zusammenarbeit mit Frau Carolin Roegler aus dem Arbeitskreis Lehmann diese pharmakologische Komponente bei allen Nitrat-Hybrid-Verbindungen durch Messung gefäßdilatierender Effekte in Organbadexperimenten charakterisiert werden.

A.10.4 Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Statin-Derivaten auf die HMG-CoA-Reduktase

Die inhibitorische Wirkung von Statinen auf die HMG-CoA-Reduktase stellt das grundlegende Wirkprinzip der Statine dar. Mit Hilfe eines Enzym-Assay-Kits sollte im Rahmen dieser Arbeit die HMG-CoA-Reduktase-Inhibition durch die synthetisierten neuartigen Statin-Derivate im Vergleich zu therapeutisch verwendeten Statinen bestimmt werden. Aus den erhaltenen Ergebnissen sollten Struktur-Wirkungsbeziehungen hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität sowie der Einfluss des organischen Nitrat-Restes erkannt werden.

A.10.5 Etablierung eines Assays zur Untersuchung der direkten A β -Aggregation

Ein mögliches Wirkprinzip der Statine, Statin-Derivate sowie der Nitrat-Statin-Hybride bei der Alzheimer-Krankheit könnte nach unserer Vorstellung die Hemmung der β -Amyloid-Aggregation sein. Daher sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, deren Ausmaß experimentell zu bestimmen. Als Grundprinzip wurde hierzu die Auswertung der *in vitro* Aggregation von reinem A β_{40} durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T oder durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ins Auge gefasst.

A.10.6 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Rifampicin und Clioquinol

Zur Überprüfung des möglicherweise erfolgreich etablierten β -Amyloid-Assays sollten auch bereits in der Literatur als aggregationshemmende Wirkstoffe beschriebene Substanzen vermessen werden. Dies sind die Arzneistoffe Rifampicin und Clioquinol, deren inhibitorische Aktivität auf die β -Amyloid-Aggregation in einer Vielzahl von Publikationen bestätigt worden ist [Tomiyama, 1994/1996; Cherny, 2001].

Nach Bearbeitung aller dieser Ziele dürfte sich herausstellen, ob die geplanten Synthesestrategien zu neuen potenten β -Amyloid-Aggregations-Inhibitoren führen können.

B Synthetischer Teil

Im Folgenden sollen die verwendeten Synthesestrategien und ihre Umsetzung näher erläutert werden. Bei Darstellung von Statin-Derivaten diene im Rahmen dieser Arbeit Lovastatin als Ausgangssubstanz.

Die Strukturaufklärung und Bestimmung der Reinheit der erhaltenen Zielverbindungen erfolgte durch Schmelzpunktbestimmung, IR- und NMR-Spektroskopie sowie Elementaranalyse oder hochauflösende Massenspektroskopie.

B.1 Darstellung von Simvastatin als Synthesestrategie für die Nitrat-Statin-Hybride **2** und **5**

Um Kenntnisse über den Einfluss einer organischen Nitrat-Gruppe auf die biologische Aktivität der Statine zu gewinnen, sollten sowohl die dem Statin-Grundgerüst möglichst ähnliche Nitrat-Simvastatin-Verbindung (**2**) als auch ein weiteres Nitrat-Statin-Hybrid der Struktur **5** dargestellt werden (Abb.B-1, vgl. Kap. A.8). Als wesentlicher Syntheseschritt bei der Umwandlung von Lovastatin in die andersartig acylierten neuen Verbindungen **2** und **5** lag eine Deacylierungs-/ Reacylierungs-Sequenz nahe, wie sie auch schon bei der Überführung von Lovastatin (**3**) zu Simvastatin (**1**) beschrieben wurde (Literatur s. Kapitel B.1.1).

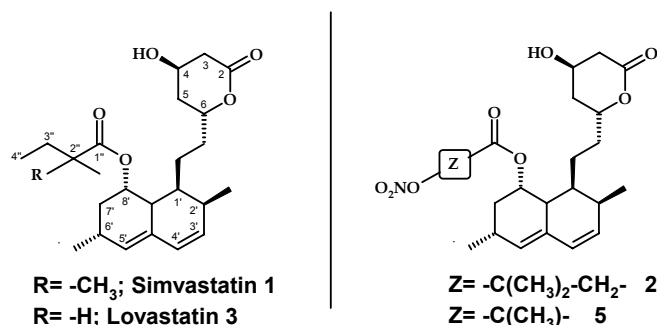


Abb.B-1 Allgemeine Nitrat-Statin-Hybrid-Struktur der Zielverbindungen **2** und **5**

B.1.1 Literaturbekanntes zur Darstellung von Simvastatin (**1**) aus Lovastatin (**3**)

Strukturell zeigt das natürlich im Bodenpilz *Aspergillus terreus* vorkommende Lovastatin einen (2S)-2-Methylbutanoyl-Rest an der C-8'-Position (Abb.B-1) des Hexahydronaphthalen-Grundgerüsts. Durch Umwandlung der (2S)-2-Methylbutanoyl-Seitenkette in einen 2,2-Dimethylbutanoyl-Rest wird das nicht natürlich vorkommende Analogon Simvastatin (**1**) dargestellt, welches im Vergleich zu Lovastatin (**3**) trotz dieser geringfügigen Veränderung eine gesteigerte Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zeigt [Moghadasian, 1999; Ditschuneit, 1991].

Eine direkte Umwandlung von Lovastatin zu Simvastatin durch eine Alkylierung der Seitenkette ist nicht möglich, da die α -Wasserstoffe des Lacton-Ringes eine höhere Azidität als der

Ester- α -Wasserstoff der Lovastatin-Seitenkette aufweisen und bei der Alkylierung bevorzugt werden würden [Askin, 1991; Wiberg, 1988].

Grundsätzlich werden zur Darstellung von **1** zwei Synthesewege zur Einführung der zusätzlichen α -Methylgruppe an der Seitenkette von **3** beschrieben.

B.1.1.1 Darstellung von Simvastatin über ein geschütztes Intermediat

Durch gezielte Ringöffnung und Schützen des Lactones soll die Azidität der α -Wasserstoffe des Lacton-Ringes verringert werden, um dann eine Methylierung der Seitenkette zu ermöglichen. Dies kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen:

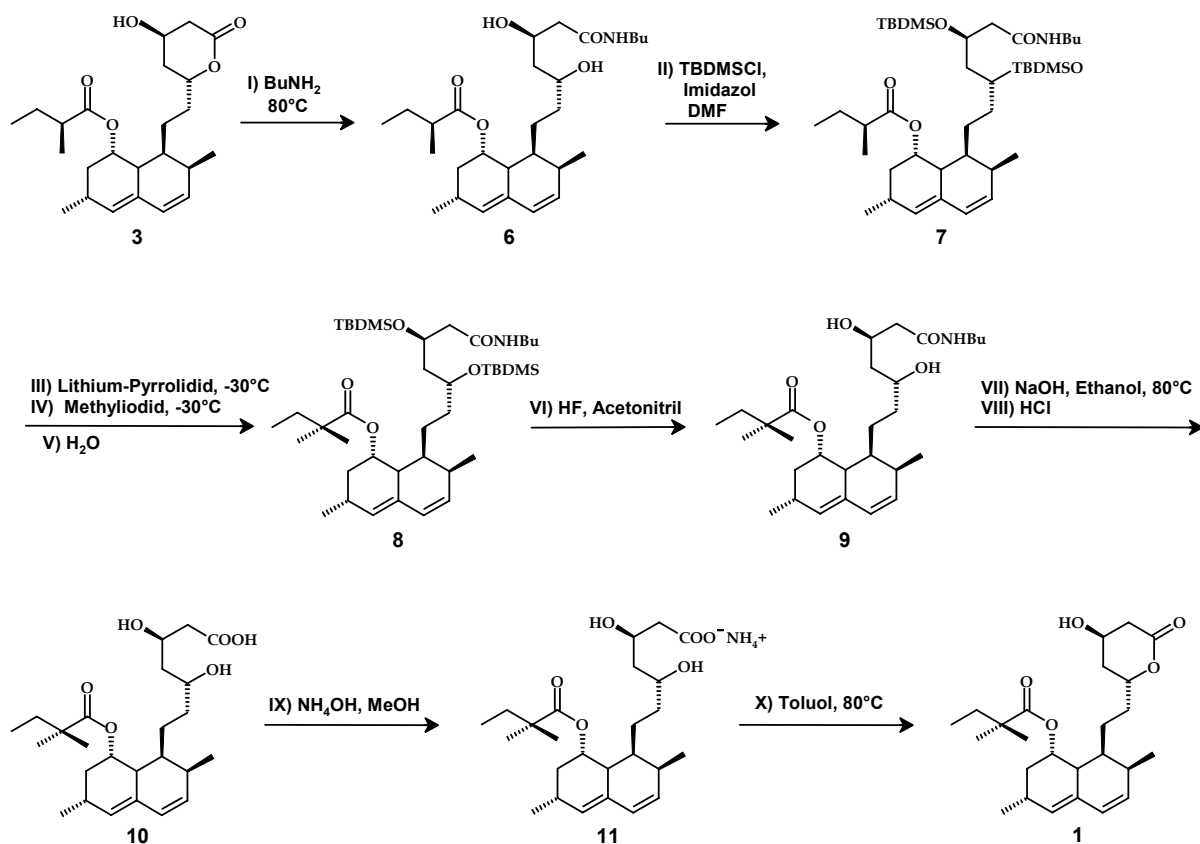


Abb.B-2 Schematische Darstellung von Simvastatin (**1**) aus Lovastatin (**3**) (modifiziert nach [Verhoeven, 1989]).

Zum Einen durch die intermediäre Bildung einer Amid-Funktion zu Verbindung **6** (Abb.B-2) [Van Dalen, 1999; Verhoeven, 1989] und darauf folgendes Schützen der zwei Hydroxyl-Funktionen durch Umsetzung mit Boronsäure [Kubela, 1995] oder zum Anderen mit tert-Butyldimethylsilylchlorid [Verhoeven, 1989] zu dem geschützten Intermediat **7**. Nach der Methylierung kann dann, wie in Abb.B-2 wiedergegeben, der Lacton-Ring zurückgebildet werden.

Ein alternativer Syntheseweg nach Sletzinger *et al.* verläuft über das Alkalimetallsalz (**12**) (Abb.B-3). Die Methylierung des geschützten Intermediates (**7**) bzw. des Alkalimetallsalzes (**12**) erfolgt mit Methyljodid in Gegenwart einer starken Base (Lithium-Pyrrolidid) selektiv an der

2-Position der 2-Methylbutyryl-Seitenkette des Hexahydronaphthalens. Nach Entschützen und Relactonisierung wird **1** als Produkt erhalten (Abb.B-3) [Sletzinger, 1985].

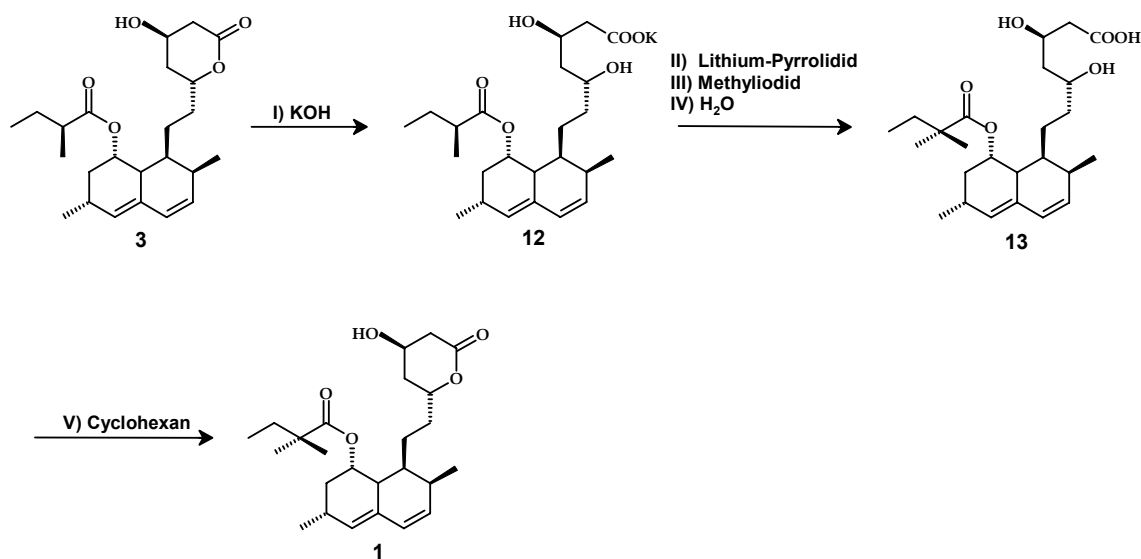


Abb.B-3 Schematische Darstellung von Simvastatin (**1**) aus Lovastatin (**3**) (modifiziert nach [Sletzinger, 1985]).

Dabak und Adiyaman beschreiben in ihrer Patentvorschrift eine modifizierte Version der zuvor beschriebenen Synthesestrategie über eine Vierstufen-Synthese. In den ersten beiden Schritten werden sowohl die Hydroxylgruppe als auch die Carboxylgruppe des Lacton-Ringes geschützt. Nach selektiver C-Methylierung mit Methyljodid in Gegenwart einer starken Base an der Lovastatin-Seitenkette erfolgt in demselben Reaktionsschritt das Entschützen der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes durch Zugabe von H₂O. In einem letzten Schritt wird die Carboxylgruppe mit verd. HCl entschützt und **1** erhalten [Dabak, 2003].

B.1.1.2 Darstellung von Simvastatin über ein lactonisches Diol

Eine weitere Synthesemöglichkeit zur Überführung von **3** in **1** wird in Patentvorschriften von der Firma Merck beschrieben [Hoffmann, 1984; Dabora, 1992]. Hier führt die Darstellung von **1** über das lactonische Diol **15**. Im ersten Schritt erfolgt zunächst eine hydrolytische Abspaltung der Lovastatin-Seitenkette im basischen Milieu mit gleichzeitiger Ringöffnung des Lactones zu **14**. Eine Relactonisierung der entstehenden 3,5-Dihydroxyheptansäure führt zu **15**. Blockieren der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes durch Acetylierung [Dabora, 1992], oder, wie nach Hoffmann *et al.*, durch Bildung eines Silylethers (**16**) (Abb.B-4) ermöglicht eine selektive Umsetzung der Hydroxylgruppe des Hexahydronaphthalens in 8'-Position mit 2,2-Dimethylbutanoylchlorid [Hoffmann, 1984]. Das Entfernen der Schutzgruppe führt in einem letzten Schritt zu **1** (Abb.B-4).

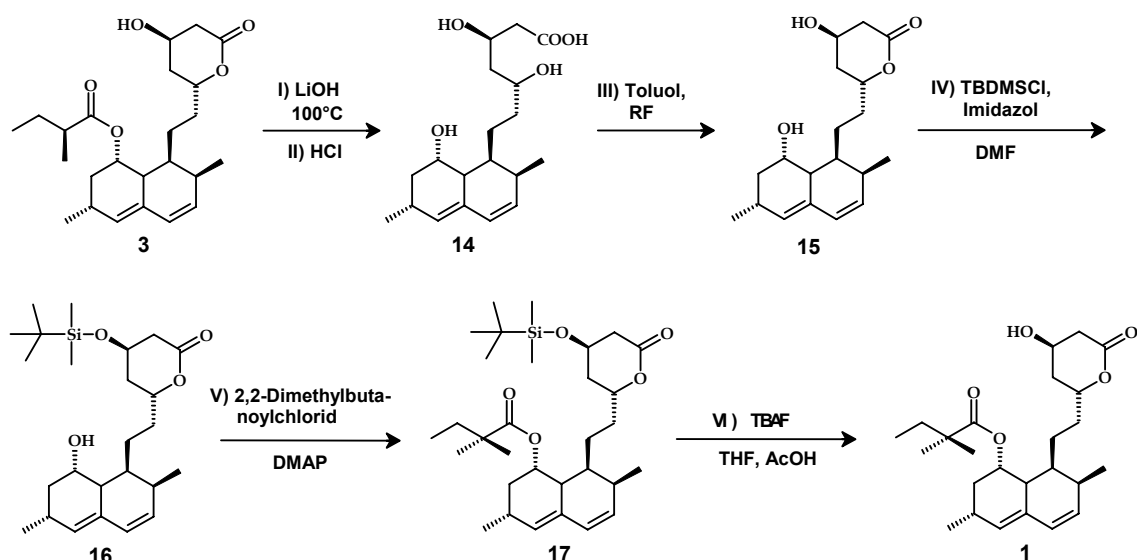


Abb.B-4 Schematische Darstellung von Simvastatin (1) aus Lovastatin (3) (modifiziert nach [Hoffmann, 1984]).

B.1.2 Syntheseplanung der Zielverbindungen 2 und 5

Zur Realisierung der Ziele dieser Arbeit erschien grundsätzlich die zweite Reaktionsfolge über **15** (Abb.B-4) als vorrangig geeignet. Aus ihr resultierte die für die Zielverbindungen **2** und **5** nachfolgende, in Abb.B-5 dargestellte Syntheseplanung. In einem ersten Schritt sollte, wie bereits unter B.1.1.2 erläutert, durch Hydrolyse die Seitenkette von **3** abgespalten und durch nachfolgende Relactonisierung und anschließendes Schützen der Hydroxylgruppe des Lactones **16** dargestellt werden. In dem letzten Teil der Synthese sollte die selektive Acylierung mit der jeweiligen Nitrosäure zu den Zielverbindungen **2** bzw. **5** führen.

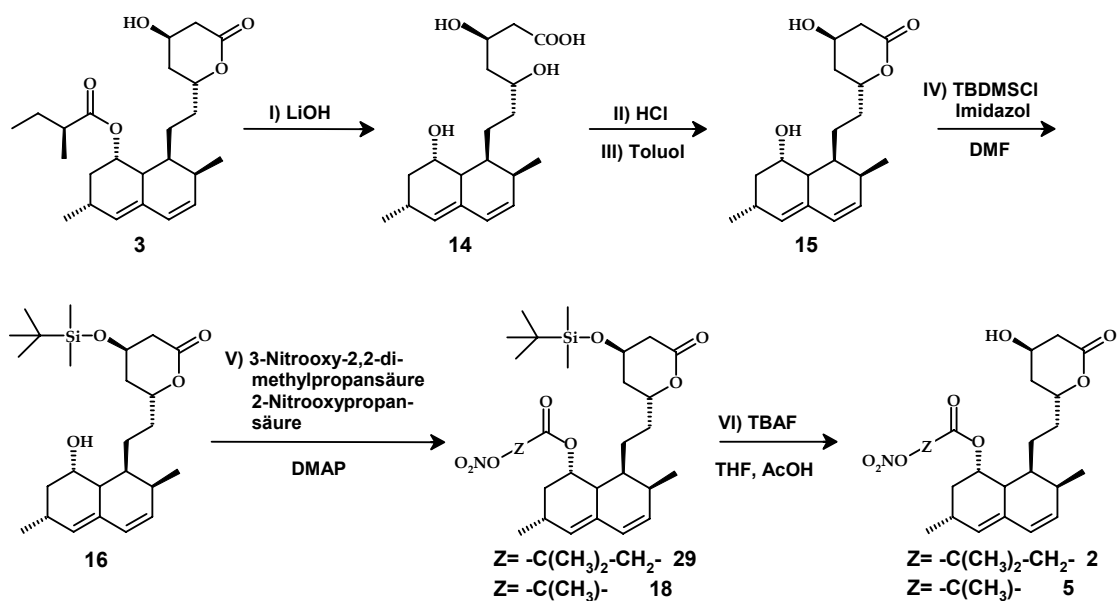


Abb.B-5 Geplante Darstellung der Zielverbindungen **2** und **5**. Hierbei führen die Umsetzung von **16** mit 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanssäure und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe mit TBAF über **29** zu der Zielverbindung **2** und die Umsetzung von **16** mit 2-Nitrooxypropanssäure und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe mit TBAF über **18** zu der Zielverbindung **5**.

B.1.3 Synthese von (4*R*,6*R*)-4-Hydroxy-*g*-{2-[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl}tetrahydro-2*H*-pyran-2-on (15)

Dem Synthesekonzept (Abb.B-5) folgend sollte zunächst das Diol (15) hergestellt werden (Abb.B-6).

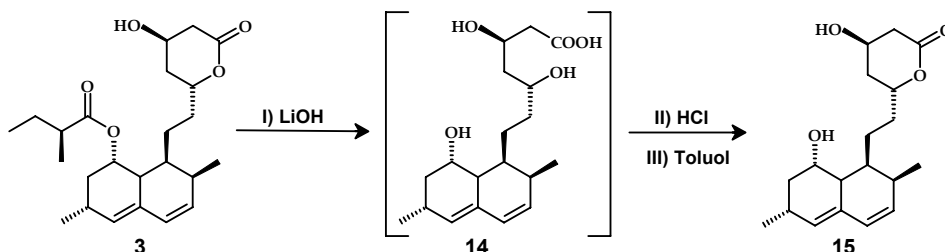


Abb.B-6 Darstellung des lactonischen Diols (15)

Nach Willard und Smith wurde **3** mit LiOH zur 3,5-Dihydroxyheptansäure (**14**) hydrolysiert [Willard, 1982]. Diese wurde nicht isoliert, sondern in der Kälte durch Zusatz von konz. HCl relactonisiert. **15** konnte nach dreistündigem Rühren als weißer Feststoff in befriedigender Ausbeute (75%) erhalten werden.

Die analytischen Daten von **15** stimmen mit der Literatur überein und belegen die gelungene Abspaltung der Seitenkette sowie die Relactonisierung. Das ^{13}C -NMR-Spektrum von **15** zeigt im Wesentlichen das gleiche Spektrum wie **3**, jedoch ohne die für die Carbonylgruppe und die beiden Methylgruppen der Seitenkette charakteristischen Signale bei 175.91 ppm, 16.45 ppm und 11.95 ppm. Des Weiteren zeigt sich eine leichte Hochfeldverschiebung des C-8'-Signals von 67.87 ppm auf 65.29 ppm durch den Einfluss der OH-Gruppe. Im ^1H -NMR-Spektrum wird die Umwandlung von **3** zu **15** ebenfalls durch eine geringere Integration der Signale im aliphatischen Bereich bestätigt.

B.1.4 Synthese von (4*R*,6*R*)-4-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy-6-{2[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl}{2[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl}-tetrahydro-2*H*-pyran-2-on (16)

15 enthält, wie in Abb.B-6 dargestellt, zwei Hydroxylgruppen, welche sich beide acylieren lassen, wobei die Hydroxylgruppe am Lacton-Ring als reaktiver einzuschätzen ist. Dies lässt eine selektive Acylierung von **15** an der Hydroxylgruppe am teilhydrierten Naphthalin-Ring in 8'-Position (Abb.B-1) aussichtslos erscheinen, so dass hier mit Schutzgruppen zu arbeiten ist (Abb.B-7).

Tatsächlich reagiert TBDMSCl selektiv, wie gewünscht, am lactonischen Hydroxyl-Rest (Abb.B-7). Dies bestätigt wiederum, dass diese OH-Gruppe tatsächlich die reaktivere darstellt und ihre Blockierung erforderlich ist.

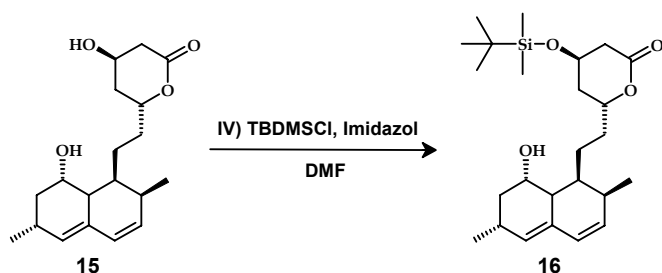


Abb.B-7 Darstellung des Silylethers (**16**)

Unter Ausschluss von Luftsauerstoff wurden, entsprechend einer modifizierten Synthesevorschrift von Willard und Smith, **15** und Imidazol in trockenem DCM gelöst. Die Zugabe von TBDMSCl führte nach Umkristallisation in n-Hexan zu **16** mit einer zufriedenstellenden Ausbeute von 65%. (Abb.B-7) [Willard, 1982].

Die ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Spektren von **16** zeigen die gleichen Signale wie die der Vorstufe (**15**). Zusätzlich erscheinen im ^{13}C -NMR-Spektrum die für die TBDMS-Schutzgruppe charakteristischen Methylgruppen-Signale bei -4.89 ppm und das für den tert-Butyl-Rest charakteristische Singulett bei 25.69 ppm bzw. im ^1H -NMR-Spektrum die jeweiligen Singuletts der Methylgruppen bei 0.07 ppm und 0.88 ppm.

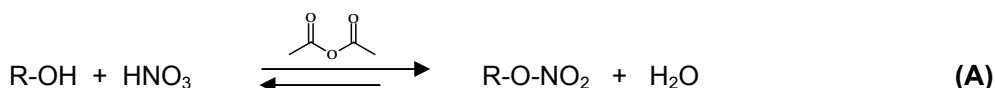
B.2 Nitratosäuren

Zur Darstellung der gewünschten Zielverbindungen **2** und **5** (Abb.B-5) mussten zunächst die entsprechenden Nitratosäuren synthetisiert werden.

Aus chemischer Sicht sind organische Nitrate Ester der Salpetersäure, die auf vielfältige Art und Weise dargestellt werden können. Unter Anderem kann die Synthese der Nitratosäuren, wie im Folgenden beschrieben, durch Umsetzung von Alkoholen mit HNO_3 in Gegenwart von Essigsäureanhydrid erfolgen [Kaufmann, 1952; Hütter, 1990]. Dieser Syntheseweg wurde für die Darstellung der Nitratosäuren verfolgt, da er bereits in früheren Arbeiten des Arbeitskreises erfolgreich war.

B.2.1 Darstellung der 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (**21**)

3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (**21**) wurde, wie von Hütter *et al.* beschrieben, durch Umsetzung von 3-Hydroxy-2,2-dimethylpropansäuremethylester (**19**) mit HNO_3 unter Zusatz von Essigsäureanhydrid und Harnstoff dargestellt [Hütter, 1990]. Bei der Veresterung eines Alkohols mit Salpetersäure dient Essigsäureanhydrid (**A**) als wasserentziehendes Reagenz. Darüber hinaus wird der Reaktion in der Regel Harnstoff (**D**) zugesetzt, um eventuell entstehende salpetrige Säure zu zerstören (Abb.B-8) [Kaufmann, 1952].



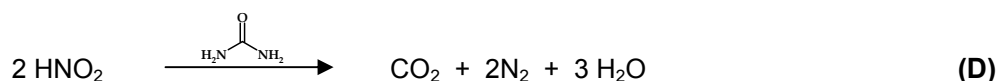
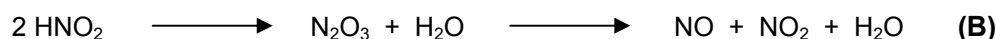


Abb.B-8 Zusatz von Essigsäureanhydrid und Harnstoff bei der Darstellung eines Salpetersäureesters

Der zunächst entstehende 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäuremethylester (**20**) wurde mit NaOH in MeOH zu der entsprechenden Säure (**21**) hydrolysiert. Da es im letzten Schritt der alkalischen Hydrolyse auch zu einer hydrolytischen Abspaltung der Nitrat-Gruppe kommen kann, ist eine strenge Überwachung des Reaktionsablaufes mittels DC nötig. Nach beendeter Reaktion wurde mit verd. HCl neutralisiert und das Syntheseprodukt schließlich aus n-Hexan als feines, weißes, kristallines Pulver erhalten (Abb.B-9).

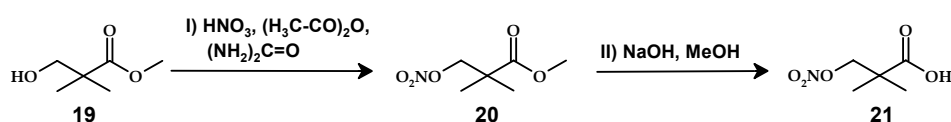


Abb.B-9 Darstellung von 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (**21**)

B.2.2 Darstellung der 2-Nitrooxypropansäure (**24**)

2-Nitrooxypropansäure (**24**) wurde ebenfalls nach der Vorschrift von Hütter *et al.* in einer zweistufigen Synthese dargestellt. Hierbei erfolgte im ersten Schritt eine Umsetzung von 2-Hydroxypropionsäureethylester (**22**) mit H_2SO_4 in Dioxan zu dem entsprechenden 2-Nitrooxy-propionsäureethylester (**23**). In einem zweiten Schritt wurde **23** durch saure Hydrolyse zu **24** überführt (Abb.B-10) [Hütter, 1990].

Das Produkt **24** wurde aus n-Hexan umkristallisiert und als weißes, dickflüssiges Öl erhalten, welches in der Kälte auskristallisiert.

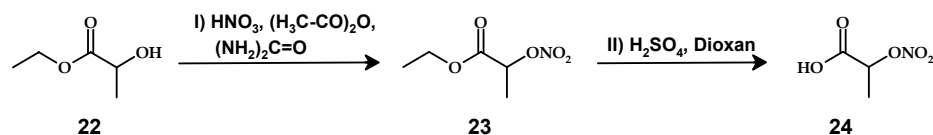


Abb.B-10 Darstellung von 2-Nitrooxypropansäure (**24**)

B.3 Umsetzung der Nitratosäuren mit dem Silylether **16** zu den Zielverbindungen **2** und **5**

Auf dem Weg zu den angestrebten Zielverbindungen **2** und **5** sollte nun **15** mit den beiden Nitratosäuren **21** und **24** verestert werden. Im Vordergrund stand hier zunächst, eine passende Methode zur Aktivierung der freien Nitratosäuren **21** und **24** zu finden, wobei alle Syntheserversuche zunächst mit Verbindung **24** erprobt wurden.

B.3.1 Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten mit Dicyclohexylcarbodiimid als Acylierungsreagenz

Hoffman *et al.* beschreiben die Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten durch Umsetzung von **15** mit underivatisierten Säuren unter Katalyse mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Der Reaktionsmechanismus folgt hierbei einer Veresterung nach Steglich, wobei DCC der Aktivierung der Carbonsäure dient. Unter Bildung eines O-Acylisoharnstoff-Intermediates (**26**) reagiert die Carbonsäure (**25**) unter Abspaltung eines stabilen Dicyclohexylharnstoffes (**28**) mit dem zu acylierenden Alkohol (Abb.B-11). Zusätzlich kann die Esterbildung durch Zusatz eines Acylierungskatalysators, wie z. B. 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), beschleunigt werden [Hoffman, 1986, Methode B].

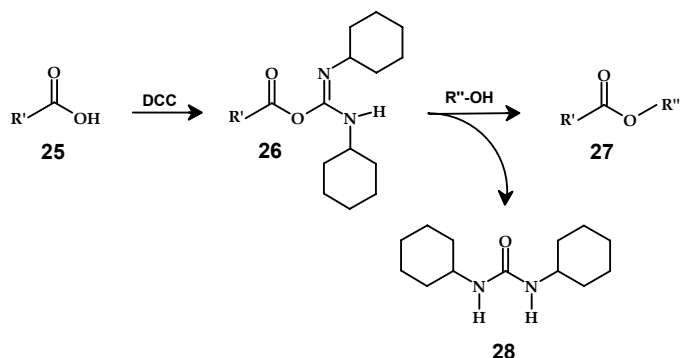


Abb.B-11 Acylierung an einer Carbonsäure – DCC als Aktivierungsreagenz.

B.3.1.1 Acylierung mit 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure - DCC als Aktivierungsreagenz

Analog der oben beschriebenen Methode wurde **16** mit der DCC-aktivierten 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (**21**) in einer Steglich-Veresterung acyliert. Die Zielverbindung **2** wurde hier nur bei Arbeiten unter Schutzgas erhalten. Nach Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe durch TBAF konnte **2** als leicht gelbliches Öl in sehr geringer Ausbeute (9%) erhalten werden (Abb.B-12).

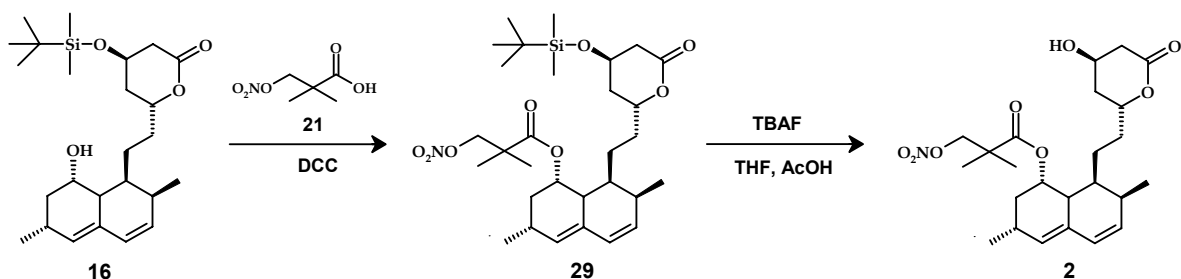


Abb.B-12 Darstellung des Nitrat-Simvastatin-Hybrides **2** – DCC als Aktivierungsreagenz.

NMR- und DC-Untersuchungen zeigten jedoch eine Verunreinigung durch **28**. Diese ließ sich weder durch Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln noch durch säulenchromatographische Trennverfahren an Kieselgel abtrennen. Somit konnte mit DCC als Aktivierungsreagenz kein reines Produkt **2** erhalten werden.

B.3.2 Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten mit *N*-(3-Dimethyl-aminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid als Aktivierungsreagenz

Auf der Suche nach alternativen Aktivierungsreagenzien wurde DCC zunächst durch *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) ersetzt. Das bei der Umsetzung mit EDC entstehende Harnstoffderivat ist wasserlöslich und kann somit leicht bei der wässrigen Aufarbeitung entfernt werden. Nach der Darstellungsvorschrift für Carbonsäureester von Ren *et al.* wurde dem Reaktionsansatz neben EDC zusätzlich DMAP als nukleophiler Katalysator zugesetzt [Ren, 2009].

Diese Acylierungsversuche führten jedoch trotz Variation der Reaktionsbedingungen und des Lösungsmittels ebenfalls zu sehr geringen Ausbeuten.

B.3.3 Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten mit Carbodiimidazol als Aktivierungsreagenz

Alternativ wurde schließlich *N,N'*-Carbodiimidazol (CDI) nach der von Staab *et al.* beschriebenen Methode zur Synthese von Carbonsäureestern (27) als Aktivierungsreagenz erprobt. Die Aktivierung der Carbonsäure (25) erfolgt hierbei über die Bildung eines Carbonsäureimidazolid-Intermediates (30). Dieses reagiert unter Abspaltung von Imidazol (31) mit dem Alkohol zum Carbonsäureester (27) (Abb.B-13) [Staab, 1962].

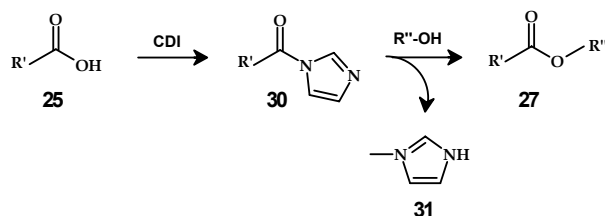


Abb.B-13 Acylierung an einer Carbonsäure –CDI als Aktivierungsreagenz.

In der Literatur ist bisher kein Anwendungsgebiet für CDI als Aktivierungsreagenz von Nitrosäuren bekannt. Anlehnend an die Arbeitsvorschrift von Roth *et al.* zur Darstellung von Carbonsäureestern wurden 21 und CDI (Äquivalente 1:1,2) in DMF bei RT 3 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 1,1 Äquivalenten 16 versetzt und weitere 3 h bei RT belassen (Abb.B-14) [Roth, 2009].

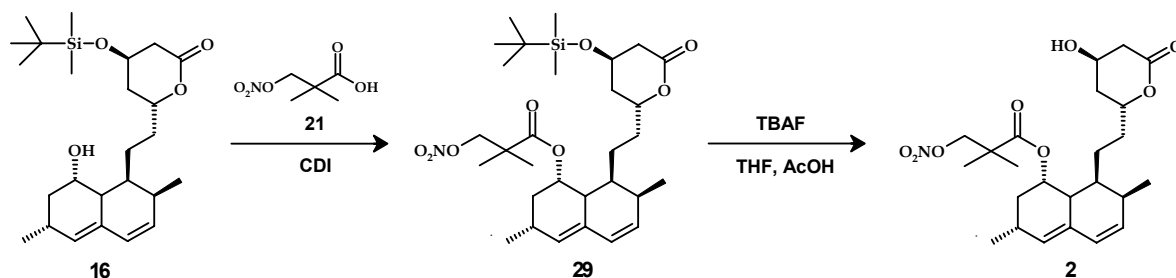


Abb.B-14 Darstellung des Nitrat-Simvastatin-Hybrides 2 – CDI als Aktivierungsreagenz.

Nach der Umsetzung von **21** mit CDI färbte sich der Ansatz langsam braun und die DC-Kontrolle deutete auf eine Zersetzung von **21** hin. Dennoch lieferte die Aufarbeitung des Ansatzes durch Säulenchromatographie, gefolgt von einer Umkristallisation aus n-Hexan, die Zielverbindung **2** in einer Ausbeute von 11%.

B.4 Darstellung von Acyl-Simvastatin-Derivaten über Nitratosäurechloride

Als Alternative zur Verwendung eines Aktivierungsreagenzes sollte nun versucht werden, die Nitratosäuren in ihre Säurechloride zu überführen, um diese dann direkt mit **16** umsetzen zu können.

Analog zu bekannten Literaturvorschriften für Nitrat-freie Säuren wurden die Nitratosäuren mit Thionylchlorid (SOCl_2) oder Oxalylchlorid ($\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$) in ihre Säurechloride überführt. Nach Stroit *et al.* wurde die Umsetzung mit $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ unter Zusatz einiger Tropfen absolutem DMF in verschiedenen Lösungsmitteln unter Kühlung durchgeführt [Stroit, 2008]. Die Umsetzung mit SOCl_2 erfolgte in Chloroform unter Zusatz von katalytischen Mengen absolutem DMF [Turconi, 1981; Hoffman, 1986]. Nach Zugabe von SOCl_2 wurde langsam bis zum Sieden erhitzt und das Reaktionsgemisch bei dieser Temperatur gehalten, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Nach Entfernung überschüssiger Reagenzien im Vakuum wurden die Nitratosäurechloride ohne Aufreinigung als Rohprodukte weiter umgesetzt.

Theoretisch erfolgt die Umsetzung eines Alkohols mit einem Säurechlorid ohne Zusatz einer Base. Jedoch wird in der Literatur häufig ein Zusatz von Hilfsbasen wie Pyridin oder Trimethylamin beschrieben, um die Ausbeuten durch Abfangen der entstehenden Säure zu erhöhen [Hoffman, 1986].

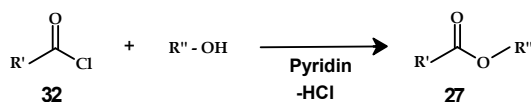


Abb.B-15 Acylierung eines Alkoholes – Säurechlorid (**32**) als Acylierungsreagenz

B.4.1 Acylierung mit 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoylchlorid (**33**)

Die Darstellung des 3-Nitrato-säurechlorids **33** erfolgte nach Turconi *et al.* und Hoffman *et al.*, wie in Abb.B-16 dargestellt [Turconi, 1981; Hoffman, 1986].



Abb.B-16 Darstellung von 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoylchlorid (**33**)

Nach Umsetzung von **21** mit SOCl_2 und einigen Tropfen trockenem DMF wurde **33** als gelb-oranges Öl erhalten. **33** wurde vor jeder weiteren Umsetzung frisch hergestellt und sofort

unter Ausschluss von Luftsauerstoff ohne Umkristallisation oder sonstige Reinigung weiter umgesetzt.

In Anlehnung an die Synthesevorschrift von Hoffman *et al.* wurde **16** in trockenem Pyridin unter Zusatz von katalytischen Mengen an DMAP gelöst und unter Kühlung bei 0°C mit 2,5 Äquivalenten **33** versetzt. Nach 1 h wurde die Reaktion bei RT für weitere 24 h gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Diethylether versetzt und zum Entfernen des Pyridins zuerst mit verd. HCl und anschließend mit ges. NaHCO₃- sowie NaCl-Lösung gewaschen. In einem letzten Schritt wurde die Hydroxylgruppe des Lactones mit TBAF in AcOH entschützt (Abb.B-17) [Hoffman, 1986, Methode A].

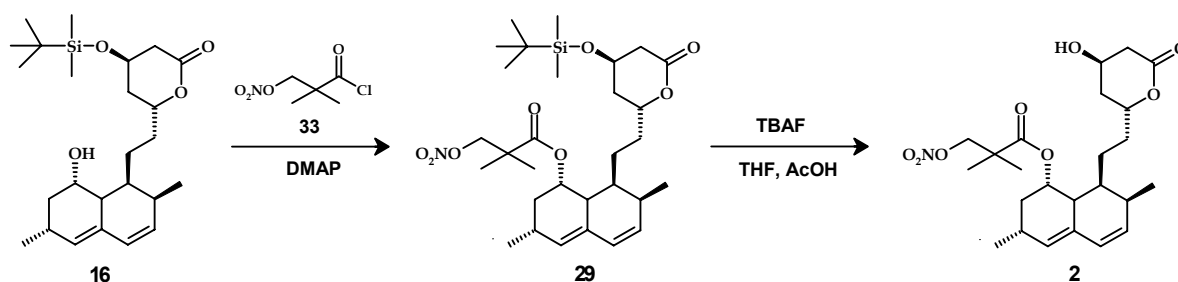


Abb.B-17 Darstellung des Nitrat-Simvastatin-Hybrides (**2**) mittels Säurechlorid

Aufarbeitung und säulenchromatographische Reinigung führten zu einem reinen Produkt **2** in einer Ausbeute von 26%. Eine positive Reaktion mit Nitratreagenz (Diphenylamin in konz. H₂SO₄) und die ausgeprägten IR-Banden der NO-Valenzschwingungen im Bereich von 1640 cm⁻¹ und 1280 cm⁻¹ bestätigen das Vorliegen der Nitratgruppe (Abb.B-18). Die ¹H-NMR-Spektren zeigen deutlich die Signale der Methylgruppen des 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoyl-Restes bei 1.25 ppm sowie das zusätzliche Signal der Carbonylgruppe im ¹³C-Spektrum bei 174.21 ppm.

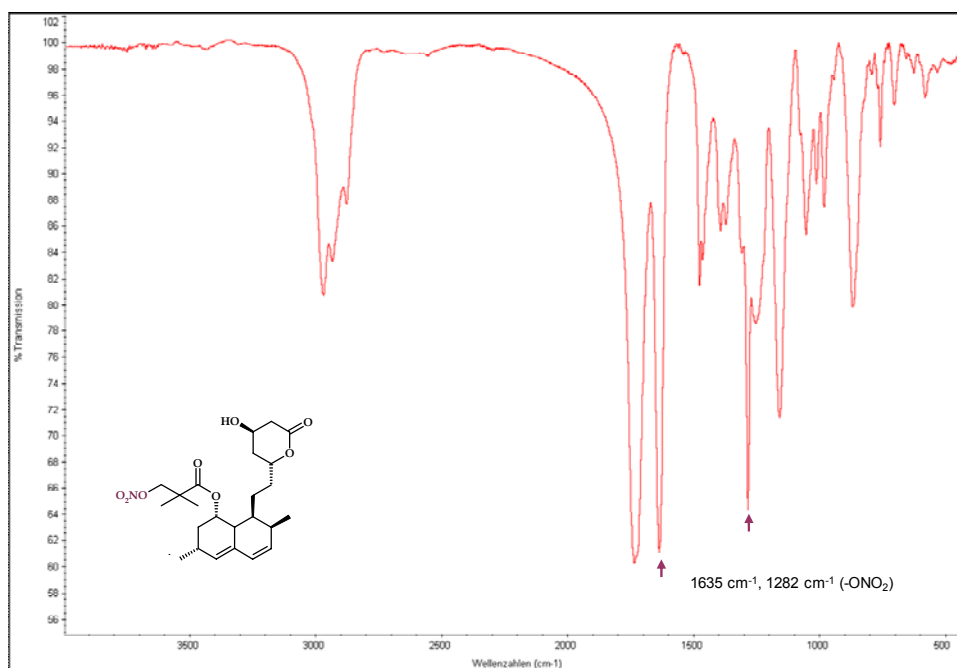


Abb.B-18 IR-Spektrum des Nitrat-Simvastatin-Hybrides (**2**) (KBr)

Des Weiteren wurden sowohl in Pyridin als auch in DCM jeweils unter Kühlung bei 0°C und bei RT Acylierungsversuche nach Hoffmann *et al.* über die Aktivierung von **24** mit DCC und CDI durchgeführt, die jedoch ebenfalls erfolglos blieben (Abb.B-20) [Hoffman, 1986, Methode A+B].

B.5 Weitere Statin-Derivate

Neben den Modifikationen an der Statin-Seitenkette des Hydronaphthalen-Gerüsts sind in der Literatur auch einige Beispiele zu finden, welche für die Substanzklasse der Statine eher untypische Modifikationen an der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes beschreiben.

Anlehnend an die patentierte Synthesevorschrift von Del Soldato [Del Soldato, 2001] sollten sowohl Lovastatin (**3**) als auch Simvastatin (**1**) mit den unter B.2.1 und B.2.2 dargestellten Nitrato Säuren **21** und **24** acyliert werden. Anstelle der Aktivierung der freien Säure mit CDI nach Del Soldato wurde die Nitratoacylierung jedoch nach der bewährten Methode über das jeweilige Säurechlorid, wie unter B.4.1 beschrieben, durchgeführt.

Neben der Darstellung von Lovastatin-Derivaten sollten, wie zuvor erwähnt, analoge Derivate ausgehend von **1** dargestellt und hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen verglichen werden. Hierzu wurde **1** zunächst nach der von Hoffmann *et al.* beschriebenen Methode ausgehend von **16** synthetisiert [Hoffmann, 1984].

B.5.1 Darstellung von Simvastatin (**1**)

Nach Hoffmann *et al.* wurde **16** in Chloroform unter Zusatz von katalytischen Mengen an DMAP gelöst und unter Kühlung mit 2,5 Äquivalenten 2,2-Dimethylpropanoylchlorid (**36**) versetzt. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion bei RT über Nacht gerührt (Abb.B-21).

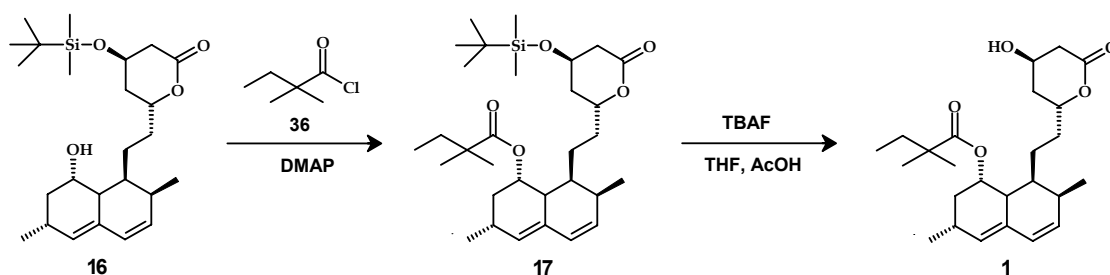


Abb.B-21 Darstellung von Simvastatin (**1**)

Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes und säulenchromatographischer Reinigung wurde **1** in zufriedenstellender Ausbeute (65%) als weißer Feststoff erhalten [Hoffmann, 1984].

B.5.2 Nitrato-Statin-Derivate

Del Soldato beschreibt in seiner Patentschrift eine Nitrato-Acylierung an der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes in zwei Schritten. Zunächst erfolgt die Acylierung mit 6-Bromcapronsäure (**37**),

gefolgt von einer Substitution des Broms mit Silbernitrat zu dem Nitrat-Statin-Hybrid **39** (Abb.B-22) [Del Soldato, 2001].

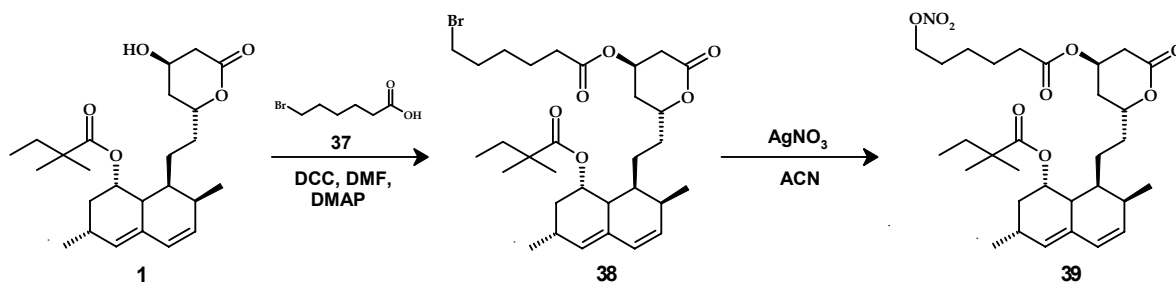


Abb.B-22 Darstellung eines Nitrat-Simvastatin-Hybrides nach Del Soldato

Im Rahmen unseres Projektes sollten (**1** und **3**) ebenfalls an der Hydroxylgruppe des Lactones nitratoacyliert werden (Abb.B-23). Allerdings wurde hierbei kein Halogenaustausch wie bei Del Soldato, sondern, wie bereits im Rahmen dieser Arbeit bewährt, die modifizierte Methode von Hoffman *et al.* über das jeweilige Nitratosäurechlorid angewendet [Hoffman, 1986, Methode A]. Hierbei zeigten sich die besten Ausbeuten in Pyridin.

Das jeweilige Statin **1** bzw. **3** wurde mit katalytischen Mengen an DMAP in trockenem Pyridin gelöst und durch langsames Zutropfen über 25 min mit dem in Chloroform gelösten Säurechlorid **33** bzw. **34** umgesetzt. Die Acylierung der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes mit **33** zu den Estern **40** und **41** verlief problemlos (Abb.B-23).

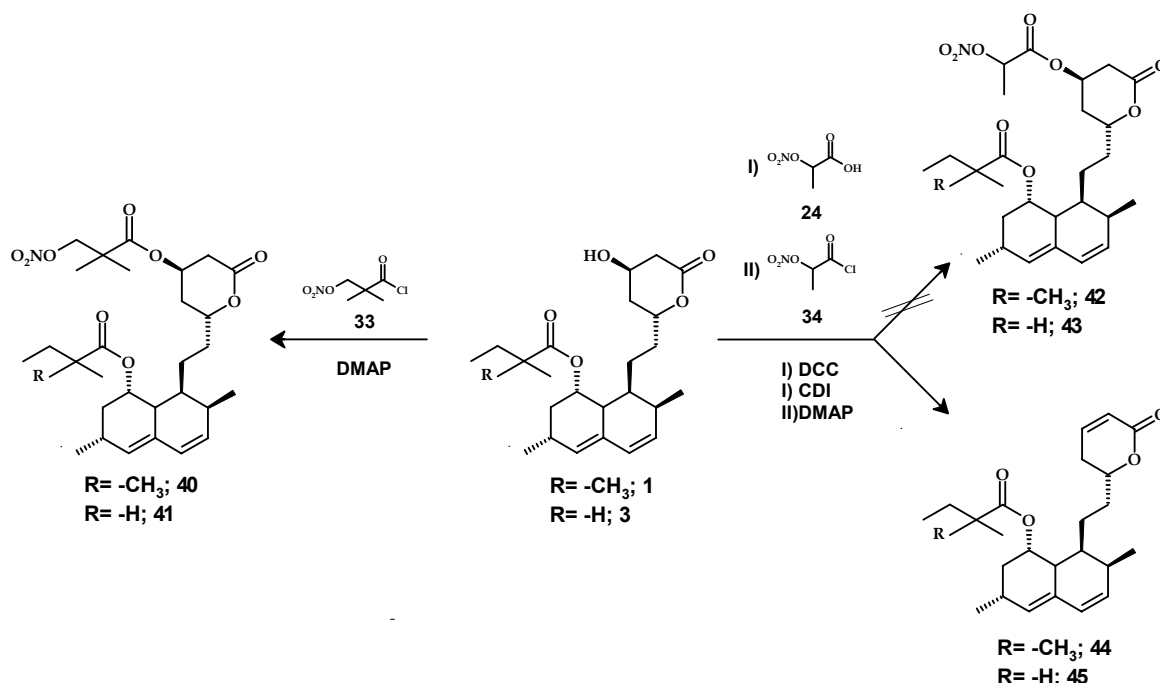


Abb.B-23 Darstellung der Nitrat-Statin-Hybride **40-43** mittels Säurechlorid

Die jeweilige Struktur und Reinheit von **40** bzw. **41** konnten durch NMR-spektroskopische-Daten und Elementaranalyse gesichert werden. Charakteristisch ist im ^{13}C -NMR das Singulett für die eingeführte Carbonylgruppe des 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoyl-Restes bei 177.63 ppm für **40**

und bei 176.51 ppm für **41** (Abb.B-24) sowie eine erhöhte Integration der beiden Methylgruppen-Signale im ^1H -NMR.

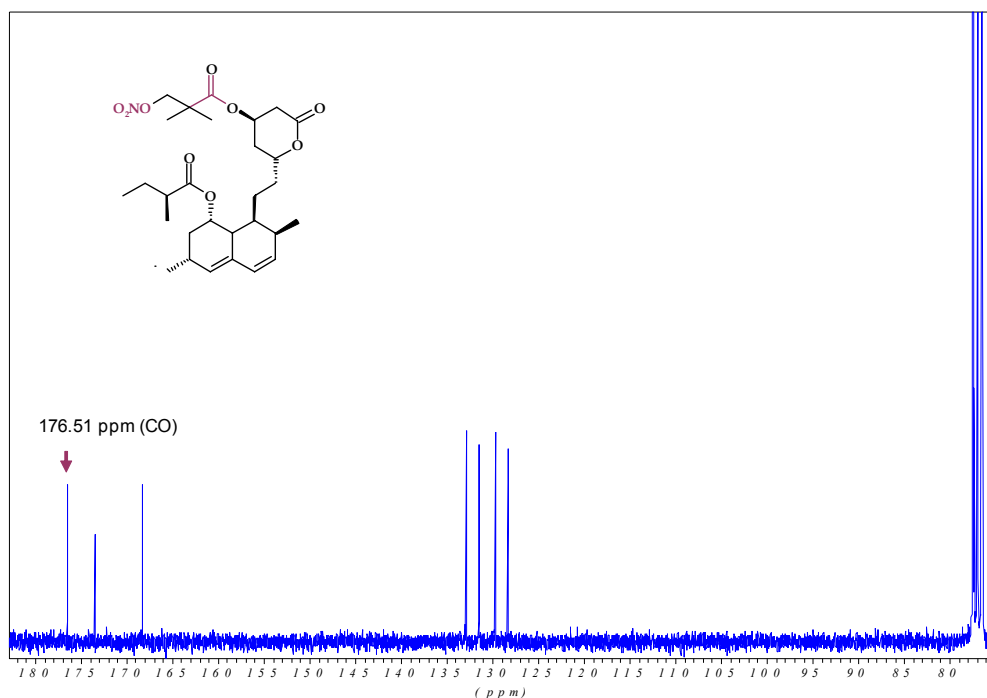


Abb.B-24 ^{13}C -NMR des Nitrat-Lovastatin-Derivates **41** (CDCl_3), aromatischer Bereich

Darüber hinaus bestätigt die charakteristische NO-Valenzschwingung bei IR-spektroskopischen Untersuchungen das erfolgreiche Einführen der Nitrat-Gruppe.

Enttäuschenderweise blieben sowohl die Umsetzung von **1** als auch die Umsetzung von **3** mit **34** zu den gewünschten Zielverbindungen **42** bzw. **43** auf diesem Weg erfolglos (Abb.B-23). Die fehlende NO-Valenzschwingung im IR-Spektrum und die ausbleibende Färbung mit Nitratreagenz bestätigten, dass die isolierten Verbindungen keinen Nitrat-Rest tragen. Ebenso misslang der Versuch der Acylierung von **1** und **3** über **24** durch Aktivierung mit CDI bzw. DCC. Die Synthese der Zielverbindungen **42** und **43** konnte daher nicht realisiert werden.

Die Struktursicherung der isolierten Substanzen mittels ^{13}C - und ^1H -NMR zeigte, dass sich jeweils das korrespondierende α,β -ungesättigte Anhydro-Simvastatin-Derivat (**44**) und das α,β -ungesättigte Anhydro-Lovastatin-Derivat (**45**) gebildet hatten (Abb.B-23). Die jeweilige Struktur und Reinheit von **44** bzw. **45** wurden durch NMR-Daten und elementaranalytisch gesichert. In den ^{13}C -NMR-Spektren zeigen sich deutlich die Signale der Kohlenstoffe des Enons im olefinischen Bereich bei 121.49 ppm und bei 144.79 ppm für **44** sowie bei 121.51 ppm und 144.73 ppm für **45** (Abb.B-25).

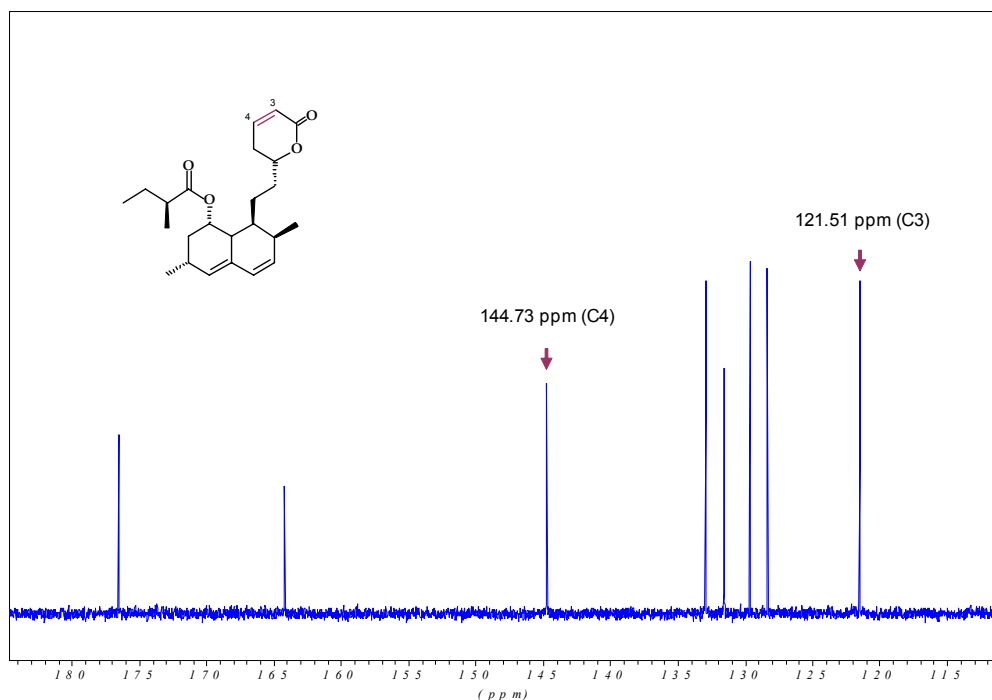


Abb.B-25 ^{13}C -NMR von Anhydro-Lovastatin-Derivat **45** (CDCl_3), olefinischer Bereich

Kim *et al.* und Malenovic *et al.* beschreiben **44** als eine der sechs für Simvastatin charakteristischen Verunreinigungen [Kim, 2003; Malenovic, 2006]. In der Patentschrift von Morgan *et al.* wird die Bildung von **44** als Nebenprodukt durch eine Eliminierung des Acetyl-Restes an der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes bei der Überführung von **3** zu **1** beschrieben [Morgan, 2005]. Ähnliches berichten Askin *et al.*, welche ebenfalls ein Eliminierungsprodukt nach Deprotonierung mit Lithium-Pyrrolidid unter ungewollter Abspaltung der Silyloxy-Schutzgruppe erhalten [Askin, 1991].

B.5.3 Anhydro-Simvastatin-Derivat (**44**) und Anhydro-Lovastatin-Derivat (**45**)

Um Kenntnisse über eine mögliche biologische Aktivität der Eliminierungsprodukte zu erlangen, sollten diese nach einer modifizierten Vorschrift von Giner *et al.* nachsynthetisiert und auf eine Beeinflussung der direkten A β -Aggregation getestet werden.

Die Dehydratisierung von **3** und **1** zu **44** bzw. **45** durch Umsetzung mit Phosphorylchlorid in trockenem Pyridin verlief problemlos (Abb.B-26) [Giner, 1989]. Beide Produkte konnten nach säulenchromatographischer Aufreinigung in guten Ausbeuten isoliert werden.

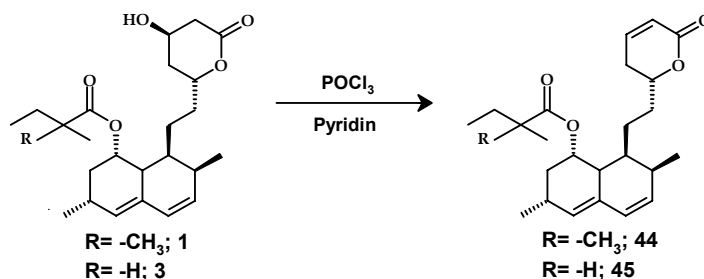


Abb.B-26 Synthesen der Anhydro-Statin-Derivate **44** und **45**

Die Struktur und Reinheit von **44** bzw. **45** wurde durch NMR-Daten und elementaranalytisch gesichert. In dem ^{13}C -NMR-Spektrum zeigen sich deutlich die Signale der Kohlenstoffe des Enons im olefinischen Bereich bei 121.49 ppm und bei 144.79 ppm für **44** sowie bei 121.51 ppm und 144.73 ppm für **45** (Abb.B-25).

B.5.4 Acyl-Simvastatin- und Acyl-Lovastatin-Derivate

Um mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen, zumindest aber den Einfluss des organischen Nitrat-Restes, erkennen zu können, sollten **1** und **3** nicht nur nitratoacyliert, sondern auch mit weiteren Carbonsäurechloriden (Abb.B-27) und Sulfonsäurechloriden (Abb.B-29) umgesetzt werden. Dies sollte durchgehend analog dem bereits in Kapitel B.5.2 (Abb.B-23) vorgestellten Syntheschema erfolgen.

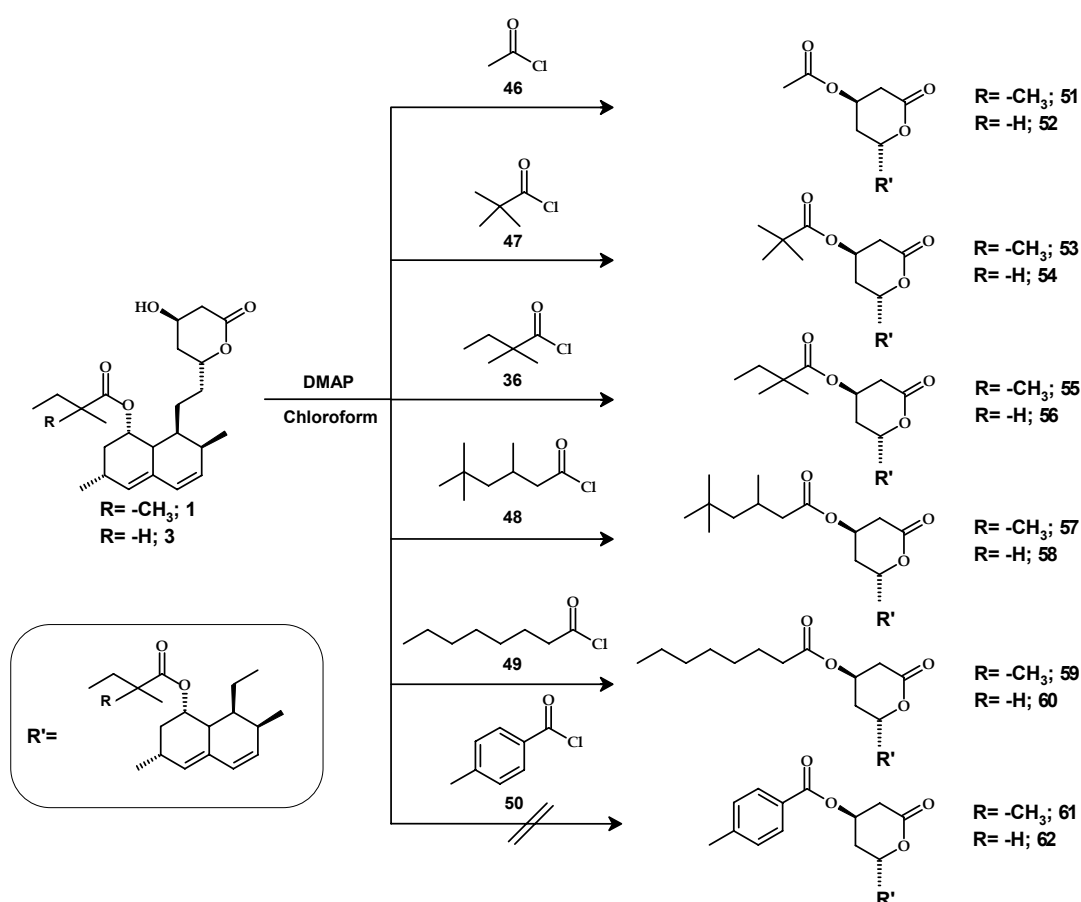


Abb.B-27 Synthesen der Zielverbindungen **51-62**

Hierzu wurden das jeweilige Statin (**1** bzw. **3**) und DMAP in trockenem DCM gelöst und bei 0°C langsam eine Lösung der entsprechenden Säurechloride (**36** bzw. **46-50**) in DCM zugetropft. Die Umsetzung wurde mittels DC überwacht, und sobald sich die Bildung der unter B.5.2 beschriebenen Anhydro-Statins-Derivate (**44** bzw. **45**) zeigte, wurde die Reaktion abgebrochen. Eine maximale Reaktionszeit von 4 h und sofortiges Aufarbeiten des Reaktionsansatzes sollte die Bildung von **44** bzw. **45** durch Abspaltung des jeweiligen Acyl-Restes verhindern.

Die Veresterung mit Acetylchlorid (**46**) und 2,2-Dimethylpropanylchlorid (**47**) verlief sowohl mit **3** zu den Zielverbindungen **52** und **54** als auch mit **1** zu den Zielverbindungen **51** und **53** problemlos. Die Strukturen und Reinheit von **51-54** konnten durch Elementaranalyse und ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten gesichert werden. Charakteristisch zeigt sich bei allen Zielverbindungen das Signal der eingeführten Carbonylgruppe der Acetyl- bzw. Pivaloyl-Seitenkette.

Die Umsetzung von **1** bzw. **3** mit 2,2-Dimethylbutanoylchlorid (**36**) führte nach Aufarbeitung jeweils zu einem gelben Öl, dessen jeweilige DC-Untersuchung in beiden Fällen auf die Bildung von zwei Derivaten hinwies. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Chloroform/MeOH konnten die beiden Zielverbindungen **55** bzw. **56** von dem unpolareren Produkt getrennt und rein isoliert werden. Struktursicherung mittels ^{13}C -NMR ergab, dass es sich bei den unpolareren Produkten um die unter B.5.2 beschriebenen jeweiligen Eliminierungsprodukte (**44** bzw. **45**, Abb.B-23) handelt.

Ebenfalls konnte die Zielverbindung **58** durch Umsetzung von 3,5,5-Trimethylhexanoylchlorid (**48**) mit **3** nach Aufreinigung durch Umkristallisation mit einer Ausbeute von 41% isoliert werden. Außerordentlich problematisch verlief hingegen die Umsetzung von **48** mit **1** zu der Zielverbindung **57**, welche neben **44** nur nach mehreren säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten in minimaler Ausbeute (9%) erhalten werden konnte.

Bei Verwendung von Octanoylchlorid (**49**) als Säurechlorid-Komponente fiel bei der Umsetzung mit **1** bzw. **3** bereits beim Einrotieren des Lösemittels jeweils ein feiner weißer Feststoff aus, welcher sich nach erneutem Waschen mit ges. NaHCO_3 -Lösung und Trocknen als analysenreines Endprodukt **59** bzw. **60** erwies (Abb.B-27).

Dabak und Adiyaman beschreiben die Darstellung eines der Zielverbindung **62** analogen Benzoat-Lovastatin-Derivates über eine Umsetzung von **3** mit Benzoylchlorid und Pyridin in DCM mit 95%-iger Ausbeute [Dabak, 2003]. Die gleiche Synthesestrategie beschreiben Stokker *et al.* für ein Nitrat-Benzoat-Lovastatin-Derivat mit Pyridin als Lösungsmittel [Stokker, 1986]. Jedoch blieben die Syntheseveruche zur Darstellung von **61** durch Umsetzung von **1** mit 4-Methylbenzoylchlorid (**50**) sowohl nach Dabak und Adiyaman in DCM mit Pyridin als Hilfsbase als auch nach Stokker *et al.* in Pyridin als Lösemittel erfolglos. Beide Varianten führten zu der Isolierung des unter B.5.2 beschriebenen Eliminierungsproduktes **44** (Abb.B-23). Ebenso erfolglos verlief die Umsetzung von **3** mit **50**, welche **45** lieferte (Abb.B-23 und Abb.B-25).

B.5.5 Versuch zur Darstellung eines Trifluoroacetyl-Lovastatin-Derivates (**64**)

Sambasivan beschreibt in seiner Patentschrift die Synthese des unter Abb.B-28 dargestellten Trifluoroacetyl-Lovastatin-Derivates (**64**). Ausgehend von **3** wird durch Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid unter Zusatz von DMAP **64** mit einer Ausbeute von 80% erhalten [Sambasivan, 2002].

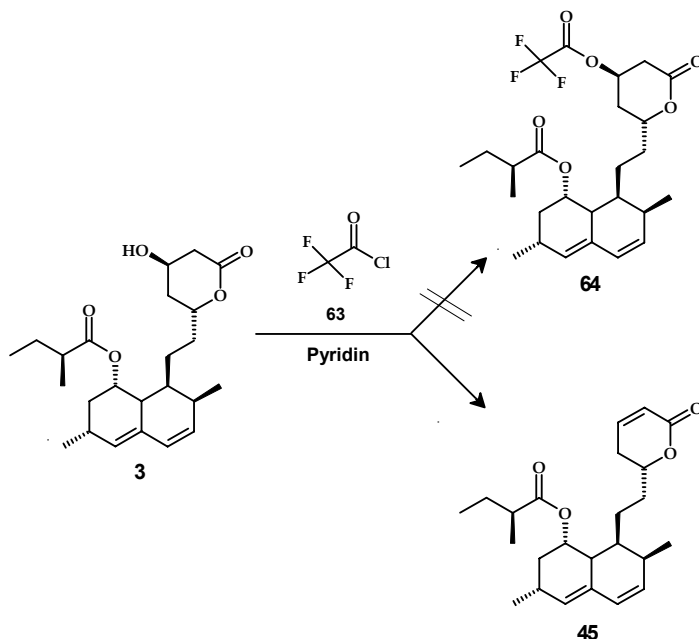


Abb.B-28 Geplante Synthese des Trifluoroacetyl-Derivates **64**

64 sollte nach der in dieser Arbeit bewährten Methode durch Umsetzung mit gasförmigem Trifluoressigsäurechlorid (**63**) dargestellt werden (Abb.B-28). Unter einer Stickstoff-Atmosphäre wurden **3** und DMAP in trockenem Pyridin vorgelegt und ein leichter Trifluoressigsäurechlorid-Gas-Strom über das Reaktionsgemisch geleitet. Bereits nach 15 min fiel ein weißer Niederschlag aus, welcher als Pyridinium-Chlorid gedeutet und somit auf die erfolgreiche Umsetzung von **63** geschlossen wurde.

^{13}C -NMR-spektroskopische Auswertungen zeigten jedoch, dass es unter diesen Reaktionsbedingungen nicht zu der Bildung der von Sambasivan beschriebenen Verbindung **64** kam, sondern nur das unter B.5.2 beschriebene Derivat **45** isoliert wurde (Abb.B-25 und Abb.B-28).

B.5.6 Versuch zur Darstellung von Tosyl-Statin-Derivaten

Den bisher hergestellten Acyl-Derivaten von **1** bzw. **3** sollten auch, wie zuvor erwähnt, einige Tosyl-Derivate zur Seite gestellt werden (Abb.B-29).

Über die Darstellungen von Tosyl-Statin-Derivaten ist in der Literatur bislang nichts bekannt. So stellte sich zunächst die Frage, ob die Bildung der gewünschten Zielverbindungen **68-73** durch TOSylierung über ein Tosylchlorid an der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes überhaupt möglich

ist. Zur Darstellung der in Abb.B-29 dargestellten Zielverbindungen **68-73** wurde in Anlehnung an die Synthesevorschrift von Kabalka *et al.* gearbeitet, welche die Tosylierung von Alkoholen beschreibt [Kabalka, 1986].

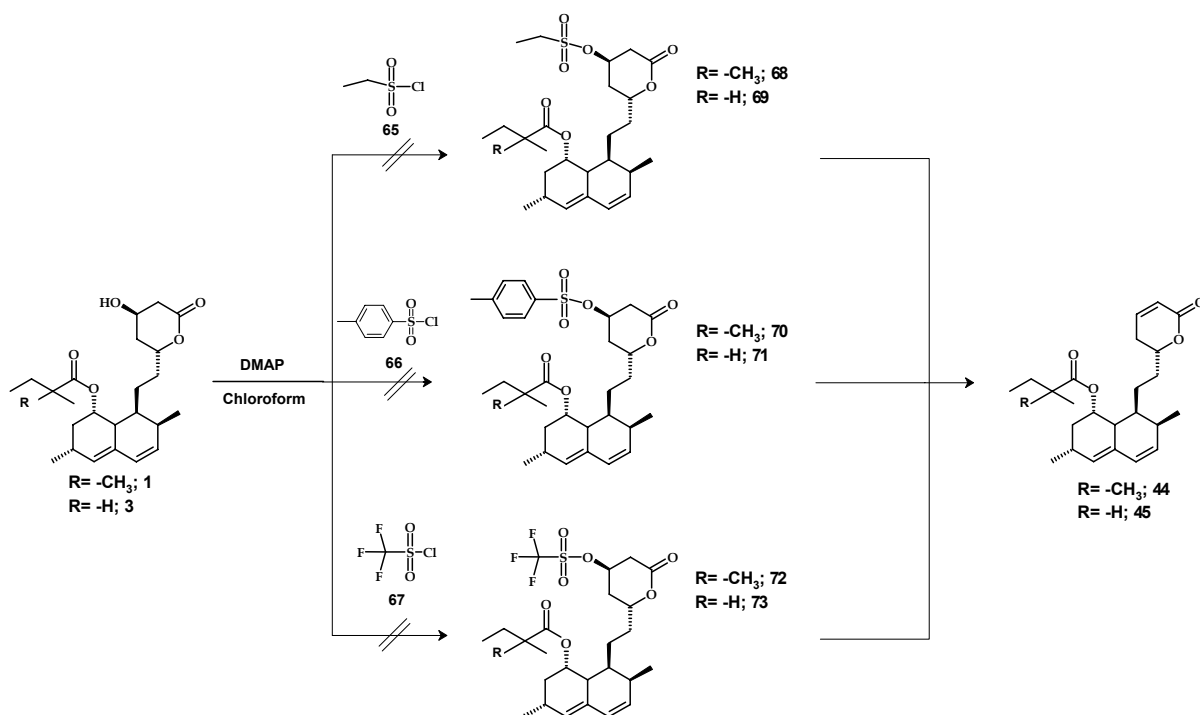


Abb.B-29 Geplante Synthese der Tosyl-Statin-Derivate **68-73**

Hierzu wurden **1** bzw. **3** in Pyridin gelöst und unter Kühlung durch langsames Zutropfen mit dem jeweiligen Tosylchlorid (**65-67**) umgesetzt. Nach 1 h wurde die Kühlung entfernt und der Ansatz bei RT gerührt. Jeder Reaktionsansatz wurde dc verfolgt und nach fast vollständiger Umsetzung des Eduktes umgehend aufgearbeitet. DC-Untersuchungen gegen **44** bzw. **45** als Kontrolle deuteten darauf hin, dass kein Eliminierungsprodukt entstanden war. Jedoch wurden nach Aufarbeitung durch Waschen der Reaktionsansätze mit NaHCO₃-Lösung und Eindampfen der Lösung des Rohproduktes in DCM ebenfalls nur **44** bzw. **45** erhalten (Abb.B-29). In den ¹³C-NMR-Spektren erscheinen deutlich die charakteristischen Signale der olefinischen Doppelbindung bei 121.49 ppm und bei 144.79 ppm für **44** sowie bei 121.51 ppm und 144.73 ppm für **45** (Abb.B-25).

In weiteren Versuchen wurden die Reaktionstemperatur bei 0°C gehalten, verschiedene Lösungsmittel erprobt sowie die Reaktionszeit auf 1 h verkürzt. Da gleichermaßen sämtliche Versuche einer Tosylierung unter milderen Synthesebedingungen scheiterten, wird vermutet, dass Tosyl-Statin-Derivate als instabil anzusehen sind. Aufgrund der Eigenschaft der Tosylate, als gute Abgangsgruppen zu fungieren, erscheint dies plausibel.

B.6 Darstellung eines Dinitrat-Simvastatin-Hybrides (74)

Ebenfalls sollte zur Ermittlung des Einflusses der Nitrooxyacylkomponente auf die pharmakologische Wirkung der Zielstruktur **2** auch eine analoge Verbindung mit zwei Nitrat-Resten untersucht werden (Abb.B-30). Um eine solche zu erhalten, wurde **15** ohne Einführung einer Schutzgruppe in Anlehnung an die Synthesevorschrift von Hoffman *et al.* mit drei Äquivalenten an **33** in Pyridin umgesetzt [Hoffman, 1986, Methode A]. **74** konnte nach Aufreinigung in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 57% isoliert werden.

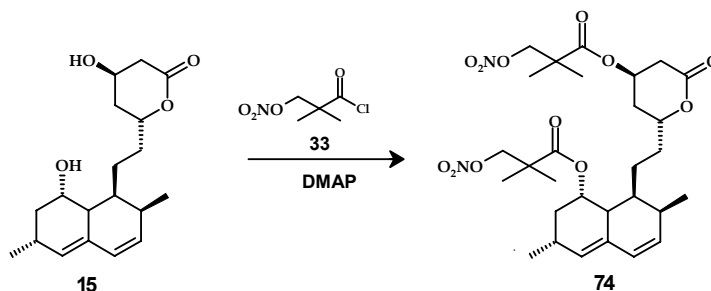


Abb.B-30 Synthese des Dinitrat-Simvastatin-Derivates **74**

Die Struktur und Reinheit von **74** konnten elementaranalytisch und durch NMR-Daten gesichert werden. Charakteristisch zeigt sich im Vergleich zu **1** im ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Spektrum eine deutliche Verschiebung der nicht-cyclischen Methylen-Gruppen ins Tieffeld durch die direkte Nachbarschaft zu dem Nitrat-Rest (Abb.B-31). Des Weiteren wurde die Einführung der organischen Nitrat-Gruppen durch eine positive Reaktion mit Nitratreagenz sowie die charakteristische NO-Schwingung bei IR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt.

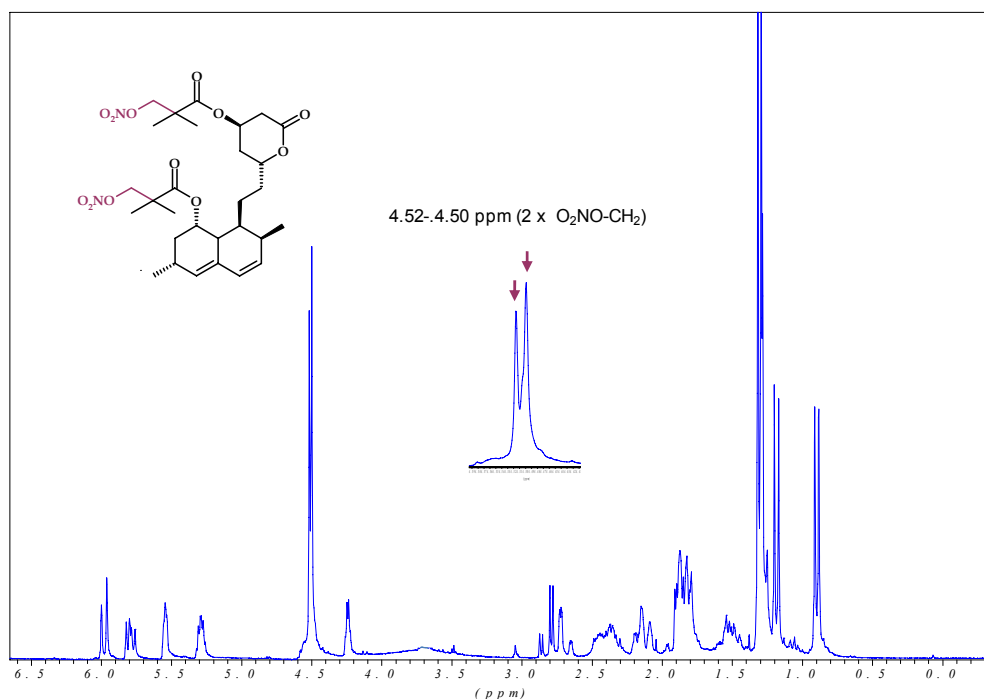


Abb.B-31 ^1H -NMR von Dinitrat-Simvastatin-Hybrid **74** (CDCl_3)

B.8 Darstellung eines 2,2-Dimethylbutanoyl-Diol-Derivates (76)

In der Literatur werden unterschiedliche Modifikationen an dem nach Abspaltung der Statin-Esterseitenkette vorliegenden hydroxylierten Hexahydronaphthalen-Grundgerüst immer erst nach Deaktivierung der anderen Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes durch die Einführung einer Schutzgruppe durchgeführt (vgl. B.1.4). Im Hinblick auf die höhere Azidität dieser lactonischen Hydroxylgruppe sollte nun ein Statin-Derivat dargestellt werden, welches am Hexahydronaphthalen noch eine freie Hydroxylgruppe trägt (Abb.B-34). Auf diese Weise sollte der Einfluss des Vorhandenseins der Statin-Seitenkette untersucht werden. Hierzu sollte **15** mit nur einem Äquivalent **36** zu der an der lactonischen Hydroxylgruppe acylierten Zielverbindung **76** umgesetzt werden.

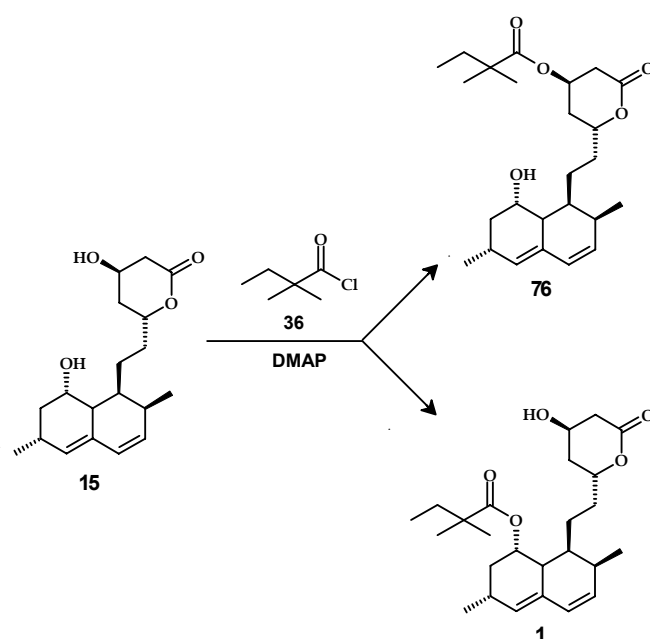


Abb.B-34 Syntheseweg zur Darstellung des 2,2-Dimethylbutanoyl-Diol-Derivates (**76**)

Entsprechend der von Wiberg *et al.* und Askin *et al.* (vgl. B.1.1) beschriebenen höheren Azidität, und der damit verbundenen erhöhten Reaktivität der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes, entstand die Zielverbindung **76**, allerdings in einem Produktgemisch mit **1**. Durch säulenchromatographische Aufreinigung wurde **1** abgetrennt und **76** in geringer Ausbeute (15%) erhalten. ^{13}C -NMR-spektroskopische Auswertungen zeigen eine deutliche Tieffeldverschiebung des Signals für den Kohlenstoff in C-8'-Position des Hexahydronaphthalen-Grundgerüsts (Abb.B-1) zu 50.84 ppm (Abb.B-35), verursacht durch die direkte Nachbarschaft zu der freien Hydroxylgruppe. Dahingegen ruft der Kohlenstoff in **1** ein zu erwartendes Signal bei 37.49 ppm hervor (Abb.B-35).

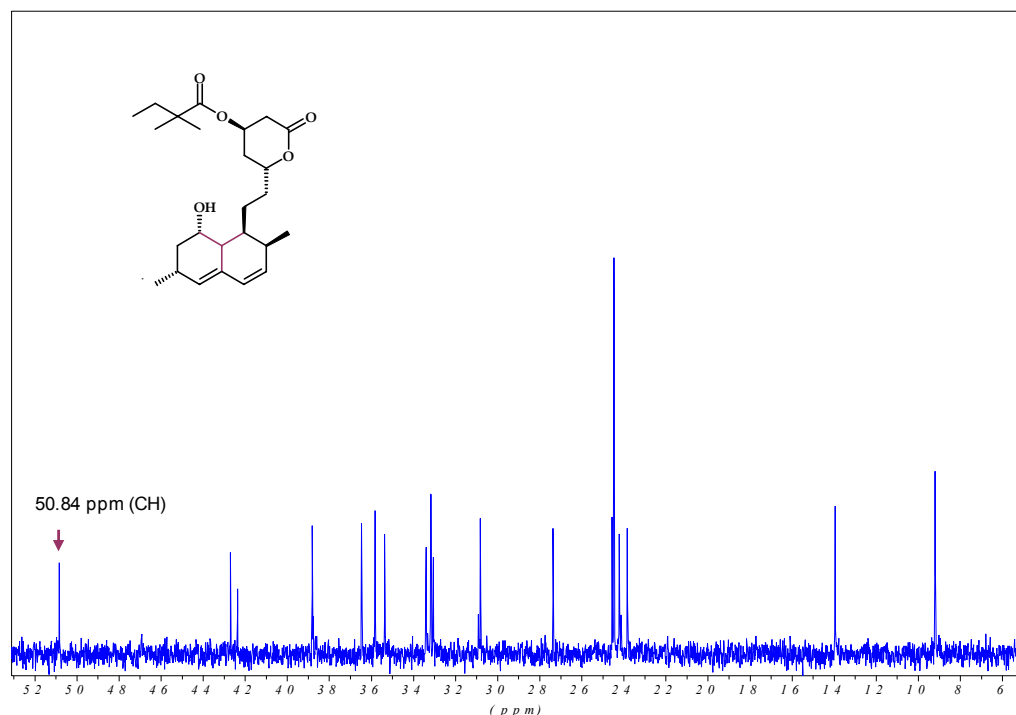


Abb.B-35 ^{13}C -NMR des 2,2-Dimethylbutanoyl-Diol-Derivates (**76**) (CDCl_3), aliphatischer Bereich

B.9 Relactonisierung von Atorvastatin-Calcium

Zur Untersuchung der inhibitorischen Fähigkeit nicht nur des Calcium-Salzes, sondern auch des entsprechenden Lactones von Atorvastatin auf die HMG-CoA-Reduktase sollte das verfügbare Atorvastatin-Calcium (**77**) in das entsprechende Atorvastatin-Lacton (**78**) überführt werden (Abb.B-36). Anlehnend an die Patentschrift von O'Sullivan und O'Neill wurde **77** im Säuren in die freie 3,5-Dihydroxyheptansäure überführt und anschließend in Toluol unter Wasserabscheidung zu **78** relactonisiert [O'Sullivan und O'Neill, 2007].

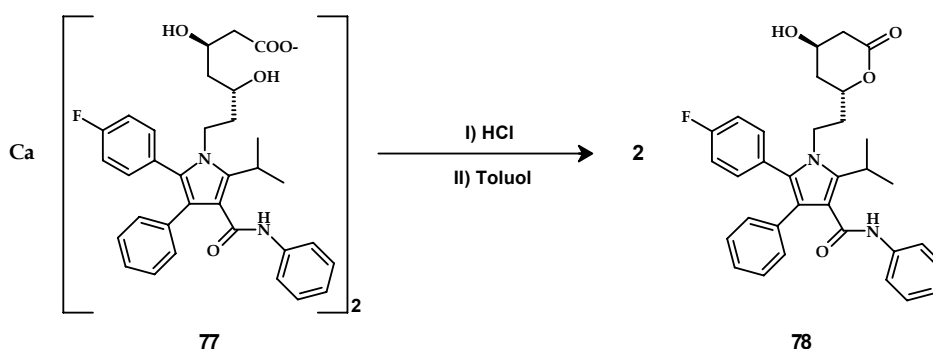


Abb.B-36 Synthese des Atorvastatin-Lactones (**78**)

Nach Aufarbeitung des Ansatzes verblieb ein wachsartiger weißer Feststoff, dessen Isolierung durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel zu einem analysenreinen Produkt **78** gelang. Die Reinheit und Struktur von **78** konnte elementaranalytisch und durch spektroskopische Methoden eindeutig nachgewiesen werden. Im Wesentlichen zeigt das ^{13}C -Spektrum analoge Signale bei Edukt und Produkt, jedoch wird die erfolgreiche Lactonisierung durch eine

Hochfeldverschiebung der lactonischen Carbonyl-Gruppe von 178.33 ppm auf 169.19 ppm bestätigt.

B.10 Modifikationen an 5-Chlor-7-iod-8-chinolinol (Clioquinol, **79**)

In den letzten Jahren wurde in klinischen Studien die Anwendung des Antibiotikums Clioquinol (**79**) bei der Alzheimer-Erkrankung untersucht. Der Wirkstoff chelatiert Metallionen wie Zn^{2+} und Cu^{2+} , welche die Aggregation von β -Amyloid fördern und somit direkten Einfluss auf die Alzheimer-Pathogenese ausüben (vgl. Kap. A.9.1).

Neben der hemmenden Wirkung von **79** auf die direkte β -Amyloid-Aggregation sollte ebenfalls untersucht werden, inwieweit dieser Effekt durch Nitroacylierung bzw. Acylierung an der Hydroxylgruppe (Abb.B-37) erhalten bleibt und somit u. a. eine Beteiligung der Hydroxylfunktion an der pharmakologischen Wirkung auf β -Amyloid untersucht werden.

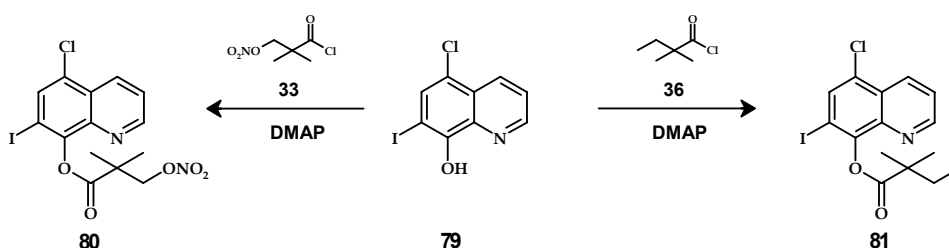


Abb.B-37 Geplanter Syntheseweg der Clioquinol-Derivate **80** und **81**

Sowohl das Nitrat-Clioquinol-Derivat **80** als auch das Acyl-Clioquinol-Derivat **81** konnten wie geplant durch Umsetzung von **79** mit **33** bzw. **36** und DMAP in einem Gemisch aus DCM und Pyridin nach der bewährten Methode, in Anlehnung an Hoffman *et al.*, nach säulenchromatographischer Aufreinigung in guten Ausbeuten erhalten werden [Hoffman, 1986, Methode A].

Struktur und Reinheit von **80** bzw. **81** wurden durch NMR-Daten und elementaranalytisch gesichert. Der organische Nitrat-Rest von **80** wurde sowohl durch eine positive Reaktion mit Nitratreagenz (Diphenylamin in konz. H_2SO_4) als auch durch ausgeprägte NO-Valenzschwingungen im IR-Spektrum bestätigt. Charakteristisch zeigt das ^{13}C -NMR-Spektrum deutliche Signale der Methylgruppen des eingeführten 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoyl-Restes bei 22.46 ppm und 22.56 ppm sowie ein zusätzliches Signal der Carbonylgruppe bei 171.75 ppm. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt ein für die beiden Methylgruppen charakteristisches Singulett mit der Integration 6 bei 1.62 ppm (Abb.B-38). Des Weiteren zeigt die Methylengruppe der Seitenkette ein Multiplett bei 4.93-4.75 ppm mit einer zu erwartenden Tieffeldverschiebung durch die direkte Nachbarschaft zu dem organischen Nitrat-Rest (Abb.B-38).

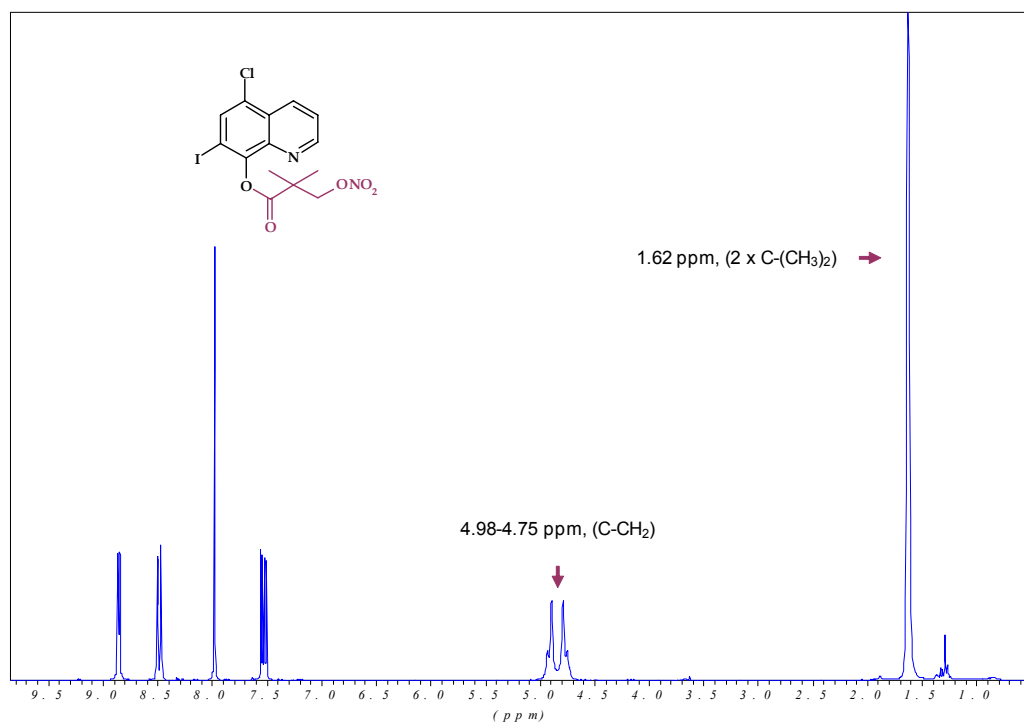


Abb.B-38 ¹H-NMR des Nitrat-Clioquinol-Derivates **80** (CDCl₃)

In dem ¹³C-NMR-Spektrum von **81** erscheinen deutlich die Signale der drei Methylgruppen des eingeführten 2,2-Dimethylbutanoyl-Restes bei 14.46 ppm, 29.76 ppm sowie 30.16 ppm. Im ¹H-NMR-Spektrum zeigen sich für die Methylgruppen ein Triplett bei 1.09 ppm, zwei Singulets bei 1.09 ppm und 1.40 ppm für die analogen Methylgruppen sowie ein Multiplett für die Methylengruppe bei 1.85-1.78 ppm (Abb.B-39).

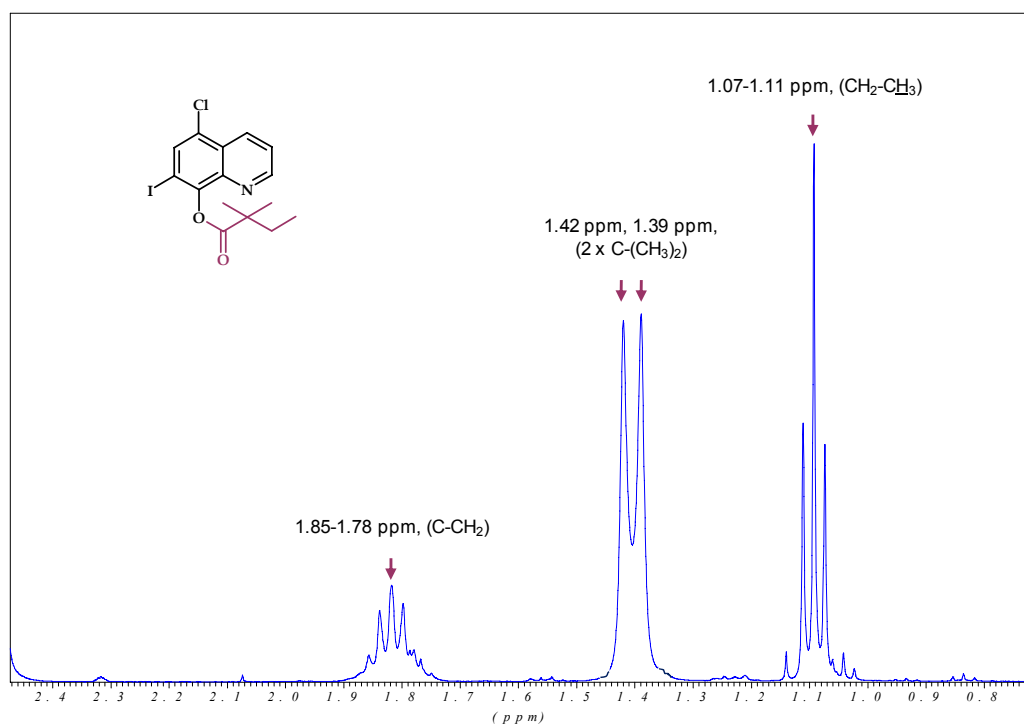


Abb.B-39 ¹H-NMR des Clioquinol-Derivates **81** (CDCl₃), aliphatischer Bereich

B.11 Modifikationen an 3-Hydroxy- γ -butyrolacton (**82**)

In der Hoffnung auf interessante biologische Aktivitäten der verschiedenen Nitratoacyl- und Acyl-Statin-Derivate sollte in einem abschließenden Teil der Arbeit der Einfluss des Hexahydronaphthalen-Grundgerüsts sowie der Statin-Seitenkette im Sinne der Identifizierung des Pharmakophors (Acyloxy-Hexahydronaphthalen oder Acyloxy-Lacton) überprüft werden. Hierzu wurde 3-Hydroxy- γ -butyrolacton (**82**) an Stelle des näherliegenden, aber sehr schwer zugänglichen 4-Hydroxy- δ -valerolactones ebenfalls nitratoacyliert bzw. acyliert und hinsichtlich eines inhibitorischen Effektes auf die β -Amyloid-Aggregation untersucht werden (Abb.B-40).

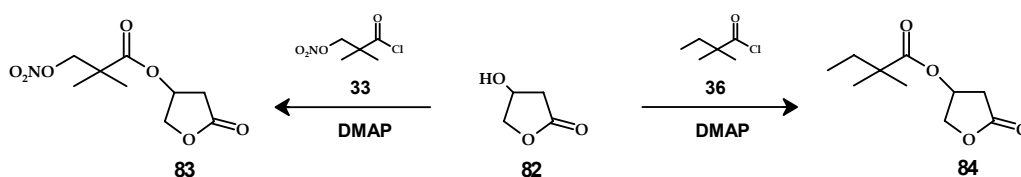


Abb.B-40 Synthesestrategie der 3-Acyloxy- γ -butyrolacton-Derivate **83** und **84**

Analog der bewährten Methode von Hoffman *et al.* wurde **84** durch Umsetzung von **82** mit **36** und katalytischen Mengen an DMAP in DCM in einer geringen Ausbeute von 15% erhalten. Das ^1H -NMR von **84** beweist die erfolgreiche Durchführung der Acylierung. Das OH-Proton des Eduktes ist nicht mehr vorhanden und die neu eingeführten Methylgruppen zeigen ein Triplett bei 0.83 ppm sowie ein Singulett bei 1.16 ppm für die beiden analogen Methylgruppen. Im ^{13}C -NMR erscheint das Signal des Carbonyl-C-Atoms des neu geknüpften Esters bei 177.41 ppm [Hoffman, 1986, Methode A].

Weniger erfolgreich gestaltete sich die Umsetzung von **82** mit **33** zu der nitratoacylierten Zielverbindung **83**, da hierbei ein Produktgemisch entstand, welches nicht aufzureinigen war. Somit konnte kein Produkt **83** isoliert werden. Auch sämtliche Versuche einer Nitratoacylierung über modifizierte Synthesestrategien, wie z. B. über eine Aktivierung der freien Säure mit CDI und DCC nach Staab *et al.* und Hoffmann *et al.*, scheiterten [Staab, 1962; Hoffmann, 1984].

B.12 Überblick aller synthetisierten und pharmakologisch getesteten Statin-Derivate

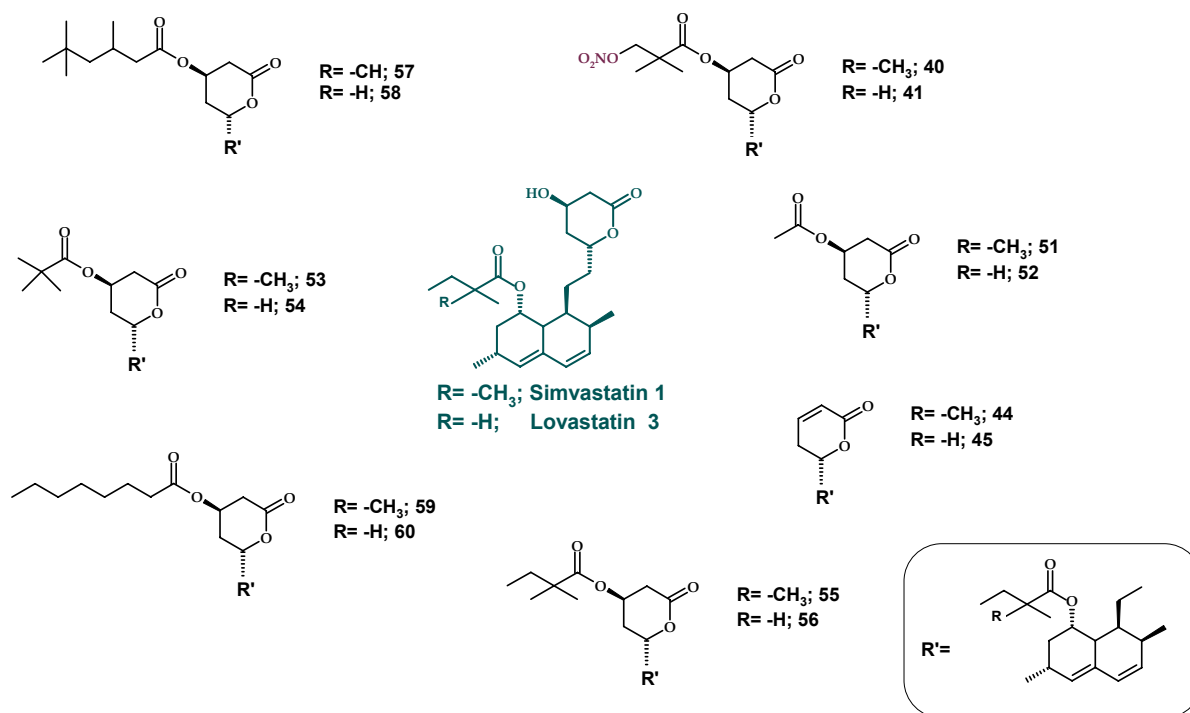


Abb.B-41 Darstellung der für die pharmakologische Testung synthetisierten Simvastatin- und Lovastatin-Acyl-Derivate

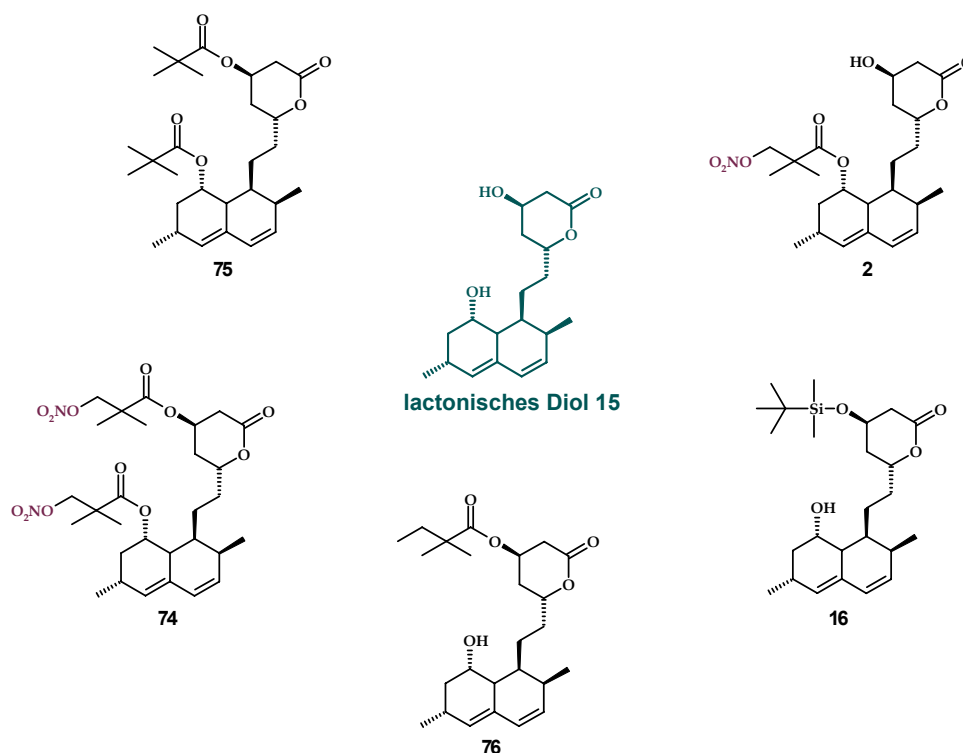


Abb.B-42 Darstellung der für die pharmakologische Testung synthetisierten Diol-Acyl-Derivate

C Pharmakologischer Teil

C.1 Untersuchung zur Vasorelaxation an Koronararterien

Statine werden bei Hypercholesterolämie und in diesem Zusammenhang zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Als Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, welche die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure katalysiert, hemmen sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo* Cholesterol-Biosynthese (vgl. A.7). Über ihre cholesterolsenkende Wirkung hinaus wurden Statine aufgrund ihrer Begleitwirkungen, sog. pleiotroper Effekte, zur Prävention und Therapie der Alzheimer-Krankheit diskutiert [Jick, 2000]. Zum Einen modulieren sie die Cholesterol-Konzentration in den cholesterolreichen Mikrodomänen der Zellmembranen, den sog. *lipid rafts* [Simons, 2000; Reid, 2007], und beeinflussen somit die Bildung und Freisetzung von A β [Reid, 2007; Kandiah, 2009]. Zum Anderen kommt es durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase ebenfalls zu einer verminderten Isoprenoid-Synthese und einer damit verbundenen reduzierten Bildung von A β [Ostrowski, 2007].

Keeble und Moore beschreiben einen möglichen Mangel bzw. eine Minderung der biologischen Aktivität von NO und die daraus resultierende Herabsetzung der NO/cGMP-Signaltransduktion als Folge einer neurodegenerativen Erkrankung [Keeble, 2002; Thatcher, 2006]. Über die Regulation der NO/cGMP-Signaltransduktion können NO-Donoren das Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit positiv beeinflussen [Thatcher, 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, wie zuvor diskutiert, einige Hybridmoleküle synthetisiert, welche die pharmakologische Aktivität von Statinen und NO-Donoren kombinieren (Abb.C1-1) und somit eine synergistische Wirkung als mögliche Alzheimer-Therapeutika aufweisen können.

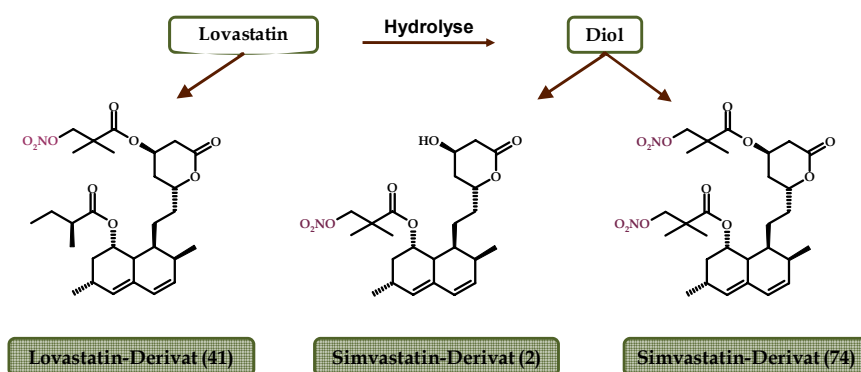


Abb.C1-1 Vereinfachte schematische Darstellung der neuartigen Nitrat-Statin-Hybride, welche ausgehend von Lovastatin (Derivat 41) bzw. dem lactonischen Diol (Derivat 2 und 74) synthetisiert wurden (Synthesen vgl. Kap. B.4.1, S.30; Kap. B.5.2, S.33 und Kap. B.6, S.41)

In Zusammenarbeit mit Frau Carolin Roegler aus dem eigenen Arbeitskreis wurden diese neuartigen Nitrat-Statin-Hybridmoleküle mit Hilfe von Organbadmessungen auf ihre Vasoaktivität untersucht. Zu Vergleichszwecken wurden ebenfalls die korrespondierende Säure (3-Nitrooxy-

2,2-dimethylpropansäure, **21**) des Acylierungsmittels 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoylchlorid und die beiden klinisch verwendeten organischen Nitrate Isosorbid-5-mononitrat (5-ISMN) und Isosorbiddinitrat (ISDN) getestet (Abb.C1-2).

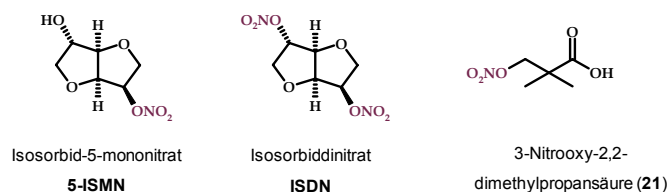


Abb.C1-2 Darstellung der getesteten Referenzsubstanzen

C.1.1 Methodenbeschreibung

Die vasodilatorische Wirkung der Nitrat-Statin-Hybride wurde an vorkontrahierten Pulmonalarterien des Schweins untersucht. Zunächst wurden kleine Äste der Pulmonalarterie von überschüssigem Gewebe befreit und in eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung in Millimol [mM]: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 und Glucose 11.5 (pH 7.4)) gegeben. Arterien, welche erst am nächsten Tag verwendet wurden, wurden über Nacht bei 4°C gelagert.

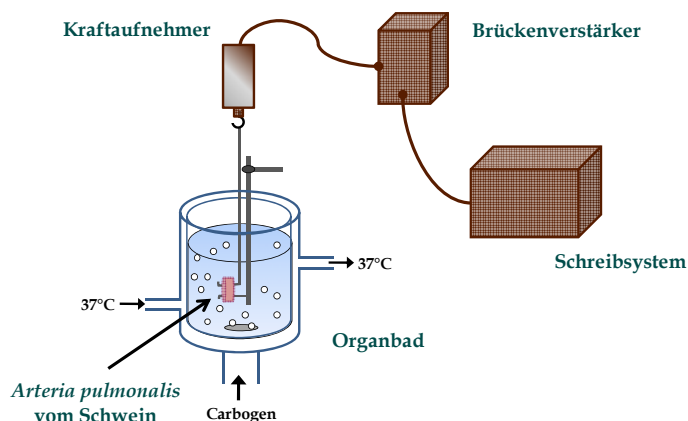


Abb.C1-3 Schematischer Aufbau der verwendeten Organbadapparatur IOA-5306

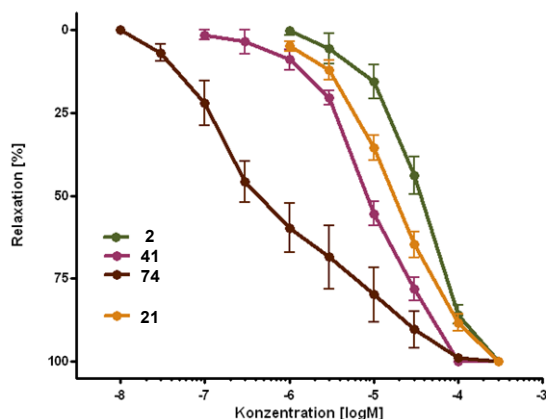
Zur Versuchsdurchführung wurden die frisch präparierten Gefäßringe (2-3 mm Länge, 1-2 mm Durchmesser) der Pulmonalarterien zwischen L-förmigen Metallhaken in dem Organbad fixiert, welches mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt und bei 37°C mit Carbogen begast wurde. Über einen Kraftaufnehmer wurde die Änderung der Gefäßspannung registriert und anschließend aufgezeichnet (Abb.C1-3).

Nach einer Vorkontraktion mit Prostaglandin F_{2α} (3 μM) und dem Erreichen eines konstanten Kontraktionsplateaus wurden die Gefäßsegmente zum Erhalt einer Konzentrations-Wirkungskurve jeweils mit einer Verdünnungsreihe der zu testenden Substanzen kumulativ behandelt. Die hierbei jeweils hervorgerufene Relaxation wurde in Relation zu der Vorkontraktion berechnet, welche als maximale Kontraktion (100%), bzw. 0%-ige Relaxation angesehen wurde.

C.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Wie erwartet zeigten alle Nitrat-Statin-Hybride einen vasodilatorischen Effekt. Da die getesteten Hybride (Abb.C1-1) das gleiche „Trägermolekül“ aufweisen, korrelierte die vasodilatorische Potenz am isolierten Gefäß mit der Anzahl der vorhandenen Nitrat-Reste im Molekül. Demnach zeigte das organische Dinitrat (**74**) mit einem EC_{50} von $7,0 \cdot 10^{-7}$ M die höchste vasodilatorische Potenz der getesteten Verbindungen mit einer dem ebenfalls zwei Nitratgruppen tragenden ISDN vergleichbaren Wirksamkeit. Bis zu einer Relaxation von ca. 50% deckte sich die Konzentrations-Wirkungskurve mit dem sigmoidalen Verlauf der Relaxationskurve des ISDN. Für höhere Relaxationswerte ging sie jedoch in einen linearen Verlauf über (Abb.C1-4). Eine solche Verlaufsform deutet häufig auf unspezifische relaxierende Gefäßeffekte hin, welche sich möglicherweise auf die schlechte Löslichkeit der Substanz zurückführen lassen. Aufgrund der schlechten Wasser-Löslichkeit aller getesteten Substanzen, welche sich insbesondere bei dem Simvastatin-Derivat **74** äußerte, mussten sie in der Verdünnungsreihe mit DMSO in Lösung gebracht werden. Dennoch konnte eine Ausfällung von **74** im Organbad bei höheren Konzentrationen nach Zugabe zur Nährlösung nicht verhindert werden. Die Auswertung erschien jedoch plausibel, da in entsprechenden Wiederholungsversuchen der Kurvenverlauf bestätigt werden konnte.

Sowohl bei den gemessenen Mononitraten **2** und **41** als auch bei **21** lagen die vasodilatorischen Effekte im Bereich von 5-ISMN. Erfreulicherweise kam es bei der Messung der Mononitrate nicht zu einer Wiederausfällung der Substanzen.



Verbindung	EC_{50} [M]
74	$3,3 \cdot 10^{-5}$
2	$8,7 \cdot 10^{-6}$
41	$7,0 \cdot 10^{-7}$
21	$1,7 \cdot 10^{-5}$
5-ISMN	$3,2 \cdot 10^{-5}$
ISDN	$4,0 \cdot 10^{-7}$

Abb.C.1-4 Konzentrations-Wirkungskurven und EC_{50} -Werte der untersuchten Nitrat-Statin-Hybride und Referenzsubstanzen

Die Versuchsergebnisse machten deutlich, dass die Anzahl der organischen Nitratgruppen im Molekül erheblichen Einfluss auf die vasorelaxierende Aktivität der Substanz hat. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass die vasodilatorische Wirkstärke dieser Nitrates durch die Einführung des großen organischen Statin-Grundgerüsts nicht gemindert wird. Vergleichsweise zeigte das „Acylierungsmittel“ **21** allein eine ähnliche, moderate vasodilatorische Wirkung an den isolierten Pulmonalarterien wie die beiden nitratoacylierten Simvastatin-ähnlichen Mononitrat-Hybride **2** und

41. Darüber hinaus scheint das sterisch anspruchsvolle Statin-Grundgerüst nicht zu einer Verminderung der Affinität gegenüber bioaktivierenden Enzymen zu führen.

C.2 Untersuchung zur Inhibition der HMG-CoA-Reduktase

In den letzten Jahren zeichnete sich immer deutlicher eine direkte Verbindung zwischen einem erhöhten Cholesterolspiegel und dem Risiko, an AD zu erkranken, ab. Darüber hinaus konnte in epidemiologischen Studien ein verringertes Auftreten der Alzheimer-Krankheit bei Patienten, welche mit Statinen behandelt wurden, beobachtet werden [Jick, 2000; Wolozin, 2000; Hajjar, 2002]. Auf welchen Wirkmechanismus sich diese Effekte zurückführen lassen, konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

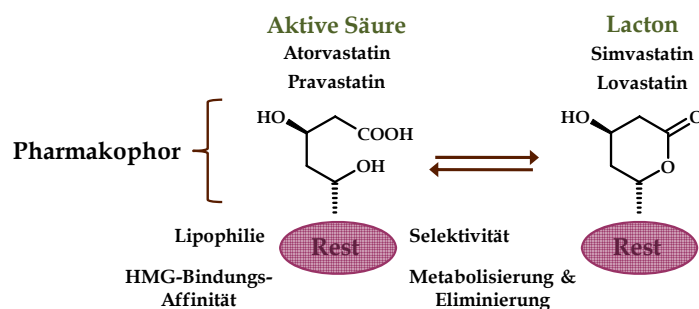


Abb.C2-1 Darstellung der biologisch aktiven Wirkform von Statinen und der „Prodrug“-Form [Bottorff, 2004]

Die eigentliche Wirkung der Statine beruht auf der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der *de novo* Cholesterol-Biosynthese. Unmittelbar nach der Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt werden die Prodrugs Simvastatin und Lovastatin durch enzymatische Hydrolyse des δ -Lactonringes in ihre biologisch aktive Form überführt (Abb.C2-1).

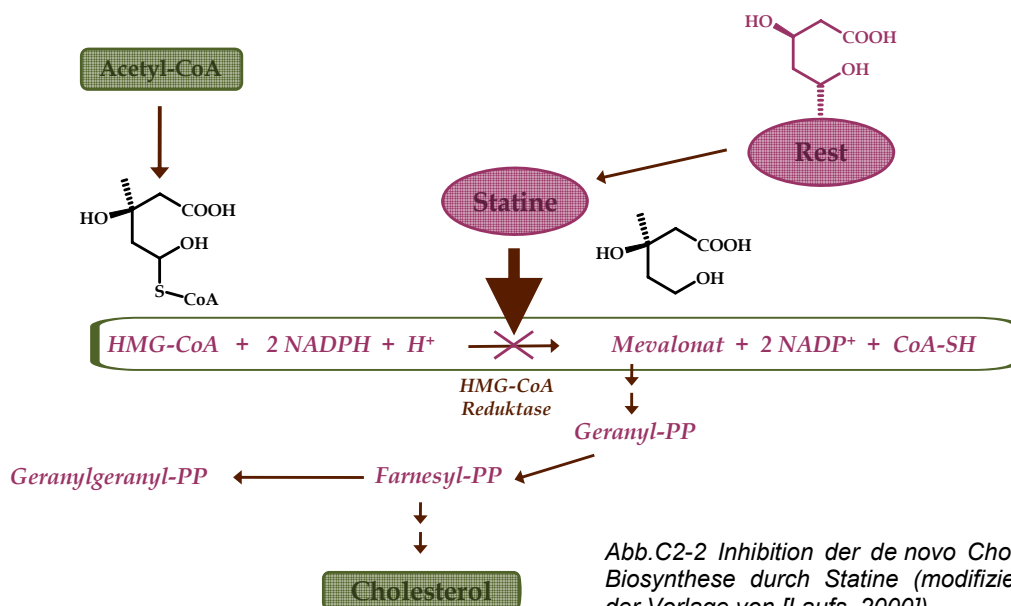


Abb.C2-2 Inhibition der *de novo* Cholesterol-Biosynthese durch Statine (modifiziert nach der Vorlage von [Laufs, 2000]).

Diese β , δ -Dihydroxycarbonsäurevarianten der Statine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit HMG-CoA auf (Abb.C2-2) [Moghadasian, 1999; Stark, 2003], wodurch sie sich als falsche Substrate in die HMG-CoA-Reduktase einlagern und diese kompetitiv hemmen können

(Abb.C2-2). Dabei zeigen Statine eine mehr als tausendfach höhere Enzymaffinität als der natürliche Ligand [Corsini, 1995; Stark, 2003].

Wie in Abb.C2-2 dargestellt, kondensiert in einem ersten Schritt Acetyl-CoA mit durch Thiolase gebildetem Acetoacetyl-CoA zu HMG-CoA. Die nachfolgende irreversible Reduktion des HMG-CoA zu Mevalonat unter Verbrauch von 2 mol NADPH/H⁺ wird durch die HMG-CoA-Reduktase katalysiert und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [Endo, 1992; Frimpong, 1994].

C.2.1 Methodenbeschreibung

C.2.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Statine wurde mit Hilfe des Assay-Kits SIGMA (C1090) die inhibitorische Aktivität ausgewählter Statine und synthetisierter Hybridverbindungen auf die HMG-CoA-Reduktase untersucht. Alle Experimente wurden in 96 Well-Platten durchgeführt.

Über die spektrometrische Messung der Absorptionsabnahme von NADPH bei dessen Oxidation zu NADP⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm können Aussagen zur Wirkstärke verschiedener Inhibitoren auf die aufgereinigte katalytische Untereinheit des Enzyms getroffen werden.

Änderungen der Absorption erlauben somit, Aussagen über die Aktivität bzw. gehemmte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase zu treffen. Änderungen der Absorption wurden mit Hilfe eines UV-Microplate Readers gemessen. Die Messungen erfolgten im Novostar (BMG Labtechnologies) bei einer Absorption von 340 nm und einer Messtemperatur von 37°C. Für alle Experimente wurden Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen mit einer Konzentration von 10⁻² M in DMSO hergestellt. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -30°C. Für jeden Experimentansatz wurden neue Verdünnungsreihen in dem Assay-Puffer hergestellt. Es wurden pro Messexperiment jeweils drei Wells mit der Testsubstanz und je ein Well als Positiv- bzw. Negativkontrolle mit den in Tab.C2-1 aufgeführten Zusammensetzungen bestückt.

Tab.C2-1 Zusammensetzung der Versuchsansätze

	Assay-Puffer	Inhibitor/Blank	NADPH	HMG-CoA	HMG-CoA-R
Negativkontrolle	182 µl	2 µl DMSO	4 µl	12 µl	-
Positivkontrolle	181 µl	2 µl DMSO	4 µl	12 µl	1 µl
Messung	181 µl	2 µl Testsubstanz	4 µl	12 µl	1 µl

Die Mischung der Bestandteile erfolgte erst mit Zugabe des Assay-Puffers. Die Absorptionsabnahme wurde unmittelbar im Anschluss alle 5 s über einen Zeitraum von 12 min gemessen und die erhaltenen Messwerte direkt mittels Microsoft Excel[®] weiter verarbeitet. Aus den erhaltenen Daten konnte für jedes vermessene Well eine Absorptions-Zeit-abhängige lineare Funktion erstellt werden. Über die Berechnung des Anstiegs jeder Linearen ließ sich nach der in

Abb.C2-3 dargestellten Gleichung die spezifische Aktivität (Unit/mgP) der Testsubstanzen ermitteln. Ein „Unit“ entspricht der Umwandlung von 1 μmol NADPH zu NADP^+ pro Minute bei einer Temperatur von 37°C. Die Einheit der spezifischen Aktivität des „Units“ ist definiert als $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein. Die berechnete Aktivität ist demnach proportional zu der durch die getestete Verbindung hervorgerufenen Minderung der Oxidation von NADPH zu NADP^+ und somit ein Maß für die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase.

$$\text{Units} / \text{mgP} = \frac{(\Delta A_{340} / \Delta \text{min}_{\text{sample}} - \Delta A_{340} / \text{min}_{\text{control}}) \cdot TV}{12.44 \cdot V \cdot 0.6 \cdot LP}$$

12.44 = ϵ^{mM} , Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340nm ist 6.22 m/M·cm·2NADPH
 TV = Totalvolumen der Reaktion (0.2 ml)
 V = verwendetes Volumen des Enzyms in ml
 0.6 = Enzym-Konzentration in mg-Protein (mgP)/ml
 LP = Lichtweg in cm (0.55)

Abb.C2-3 Darstellung der theoretischen Berechnung der spezifischen Aktivität

Zum besseren Ergebnisvergleich wurde der für die Positivkontrolle erhaltene „spezifische Aktivitäts-Wert“ als 100% angesehen und die für jeden Inhibitor erhaltenen Werte wurden hierzu in Relation gesetzt. Hierdurch wurde über die in Abb.C2-4 dargestellte Gleichung eine prozentuale Inhibition der spezifischen Aktivität erhalten. Die im Ergebnisteil angegebenen Werte für die spezifische Aktivität bzw. für die prozentual berechnete inhibitorische Wirkaktivität sind Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

$$I_{\text{Aktivität}} = (1 - I_{A_i} / I_{A_c}) \cdot 100\%$$

A_i = berechnete spezifische Aktivität mit Inhibitor
 A_c = berechnete spezifische Aktivität ohne Inhibitor

Abb.C2-4 Darstellung der theoretischen Berechnung für die prozentuale Aktivität

C.2.1.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte

In darauf folgenden Experimenten wurde der Versuchsablauf so modifiziert, dass die IC_{50} -Werte einiger ausgewählter Statine und Hybridverbindungen ermittelt werden konnten. Der IC_{50} -Wert stellt neben der spezifischen Aktivität ebenfalls ein Maß für die durch die getestete Verbindung hervorgerufene inhibitorische Aktivität der Oxidation von NADPH zu NADP^+ und somit der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase dar (Abb.C2-2). IC_{50} ist diejenige Inhibitorkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung des Enzyms führt. Ein anderer Begriff hierfür ist EC_{50} , die effektive Konzentration bei 50% Inhibition. Zur Erstellung einer Inhibitionskurve wurde von der jeweiligen Testsubstanz eine Verdünnungsreihe mit je sieben Verdünnungen hergestellt (Konzentrationen siehe Abb.C2-7, S.57), wobei die Verdünnungsstufen von der Löslichkeit und der Aktivität bestimmt wurden. Von jeder Verdünnungsstufe wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen, und die erhaltenen Werte wurden graphisch gegen die Absorption aufgetragen.

Die Absorption wurde, wie unter Kap. C.2.1 beschrieben, alle 7 s über einen Zeitraum von 15 min gemessen, und die erhaltenen Daten wurden mit Microsoft Excel[®] wie folgt bearbeitet. Aus den ermittelten Absorptions-Zeit-Kurven wurde die Differenz zwischen dem oberen und unteren Plateau jeder Kurve ermittelt. Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte wurden die in Excel bestimmten Werte mit der Software Graph Pad PRISM[®], Version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego

CA, USA) weiter verarbeitet. Für jede Konzentration wurden die erhaltenen Differenzwerte gemittelt und in halblogarithmischer Form gegen die Konzentration aufgetragen. Aus den erhaltenen sigmoidalen Absorptions-Konzentrationskurven wurden mit Hilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse anhand der Funktion „sigmoidal-dose-response“ die IC_{50} erhalten. Auch hier sind die im Ergebnisteil dargestellten IC_{50} -Werte Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten, welche mit voneinander unabhängigen Verdünnungsreihen durchgeführt wurden.

C.2.2 Ergebnisse und Diskussion

C.2.2.1 Spezifische Aktivität

Vorrangig sollte anhand des nitrooxylierten Simvastatin-Derivates **2** der Einfluss des organischen Nitrat-Restes auf die HMG-CoA-Reduktase-Hemmung untersucht werden. Bei **2** wurde das Simvastatin-Grundgerüst größtenteils bewahrt und der organische Nitrat-Rest ohne *spacer* eingefügt. Hierdurch könnte der eigentliche Wirkmechanismus bzw. die inhibitorische Wirkaktivität von **1** unbeeinflusst bleiben. Tatsächlich zeigte das Nitrat-Simvastatin-Derivat **2** nur eine geringe Abschwächung der Wirkpotenz im Vergleich zu **1** selbst. Nach Inhibition mit **2** werden noch 17% NADPH oxidiert, im Vergleich zu **1** mit einer 7%-igen Oxidation von NADPH (Abb.C2-5).

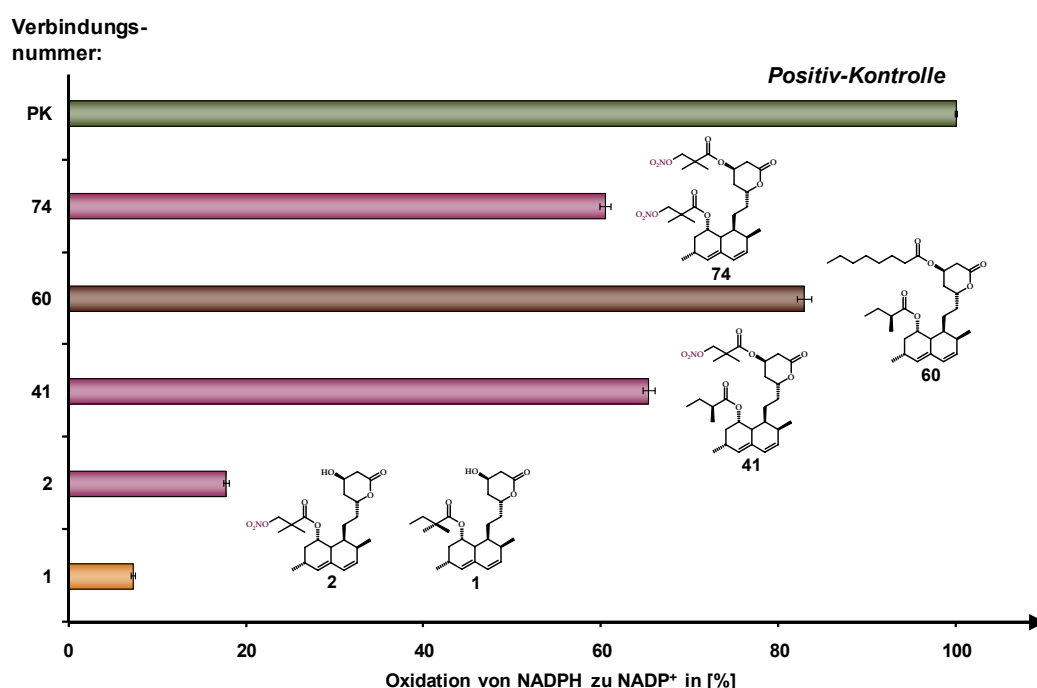


Abb.C2-5 Darstellung der prozentual berechneten inhibitorischen Wirkaktivität einiger modifizierter Statin-Derivate (organisches Nitrat tragende Derivate: lilafarbene Balken) sowie Simvastatin (gelber Balken)

Der lipidsenkende Wirkmechanismus beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit der Carbonsäurekette aller Statine mit 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), dem eigentlichen Substrat der *de novo* Cholesterol-Biosynthese. Besonders das Auftreten zweier Hydroxylgruppen der biologisch aktiven Säure (Abb.C2-1) in den Positionen 3 und 5

gewährleistet eine optimale Wechselwirkung mit dem Enzym (Abb.C2-1 und Abb.C2-2, S.52) [Stark, 2003]. Demnach schwächt eine strukturelle Modifikation an diesen OH-Gruppen grundsätzlich die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase. Eine Nitratocylierung an der lactonischen Hydroxylgruppe in 3-Position (Verbindungen **41** und **74**) minderte tatsächlich den inhibitorischen Effekt deutlich (Abb.C2-5). Erstaunlicherweise verbesserte eine zweite Nitrat-Acylierung (**74**) die Inhibition wieder geringfügig (Vergleiche **74** mit einer 60%-igen Oxidation von NADPH und **41** mit einer 65%-igen Oxidation). Allerdings ist fraglich, ob dies auf die organischen Nitrat-Reste zurückzuführen ist, da Verbindung **74** auch eine zusätzliche Methylgruppe in der Esterseitenkette aufweist. Diese zusätzliche Methylgruppe in 2''-Position führte bei Simvastatin (**1**) im Vergleich zu Lovastatin (**3**) ebenfalls zu einer leicht erhöhten Aktivität [Stark, 2003]. Ebenso minderte eine Acylierung mit Octanoylchlorid zum Statin-Derivat **60** die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase deutlich (Abb.C2-5).

Das Fehlen der Hydroxylgruppe in 3-Position (Anhydro-Lovastatin-Derivat **45**) führte mit einer Oxidation von NADPH von 68% zu einem nahezu vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität (Abb.C2-6).

Die Natur der Seitenkette an der Esterfunktion wird in der Literatur als wenig bedeutsam bezeichnet [Stark, 2003], offensichtlich sollte die Esterfunktion selbst aber vorhanden sein. So führte ihre Abspaltung (lactonisches Diol **15**) zu einem drastischen Verlust des inhibitorischen Effektes mit einer Oxidation von NADPH von 79% (Abb.C2-6).

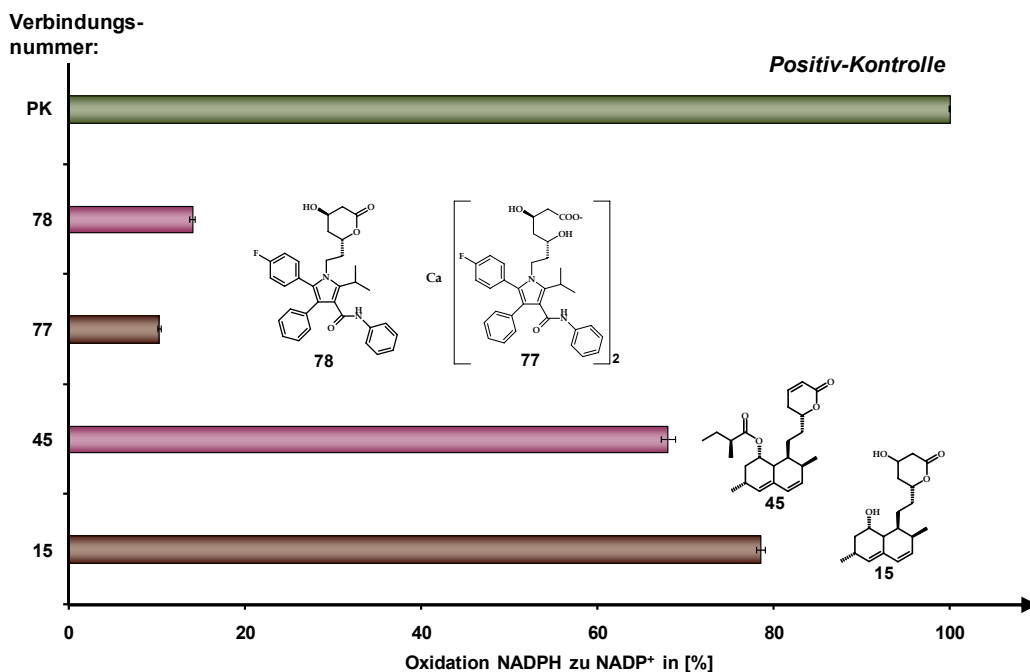


Abb.C2-6 Darstellung der prozentualen inhibitorischen Wirkaktivität des Eliminierungsproduktes von Lovastatin **45**, des lactonischen Diols **15** sowie des Calcium-Salzes von Atorvastatin **77** und dessen relactonisierten Produktes **78**

Wie zuvor diskutiert, postulieren viele Publikationen die Ring-offene Dihydroxyheptansäure-Form als aktive Wirkform der Statine (Abb.C2-1, S.52). Umso erstaunlicher ist, daß nach hier durchgeführten Experimenten das offenkettige Calcium-Salz des Atorvastatin (**77**) und das

analoge Lacton-Derivat **78** sehr ähnliche inhibitorische Effekte mit einer Oxidation von NADPH von 10% (**77**) bzw. 14% (**78**) aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Modifikation, sei es durch Acylierung der offensichtlich essentiellen OH-Gruppe in 3-Position oder ihrer Eliminierung zu Verbindung **45**, zu einem Verlust an Statin-typischer Wirkaktivität führte. Durch die Einführung eines organischen Nitrat-Restes an das Simvastatin-Grundgerüst konnte der inhibitorische Effekt nicht weiter ausgeprägt werden, fiel aber auch nicht deutlich ab (vgl. **2** mit **77** bzw. **78**).

C.2.2.2 IC_{50} -Werte

Ein direkter Vergleich mit den in der Literatur gefundenen IC_{50} -Werten der vermessenen Statine ist nicht möglich, da diese unter Zell-basierten Assay-Bedingungen vermessen wurden. Auch hängen die gefundenen IC_{50} -Werte stark von den unterschiedlichen Zelltypen ab. Corsini *et al.* beschreiben einen deutlich stärker ausgeprägten inhibitorischen Effekt von Simvastatin (IC_{50} = 3.6 nM) im Vergleich zu dem hydrophileren Inhibitor Pravastatin (IC_{50} = 1354 nM), bestimmt in Maus-Lymphozyten [Corsini, 1995]. Auch Van Vliet *et al.* beschreiben Simvastatin (IC_{50} = 4.0 nM) als stärkeren Inhibitor im Vergleich zu Pravastatin (IC_{50} = 110.0 nM), bestimmt in extrahepatischen Zellen [Van Vliet, 1996]. Dagegen zeigen sich beide Statine in humanen Hepatozyten, dem Zielgewebe dieser Arzneistoffe im Menschen, als gleich starke Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im Bereich von 0.2-8.0 nM [Cohen, 2000]. Einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt zeigt der vollständig synthetisch hergestellte Inhibitor Atorvastatin mit einem IC_{50} -Wert von 7.5 nM, gemessen in Mikrosomen der Rattenleber [Roth, 1991].

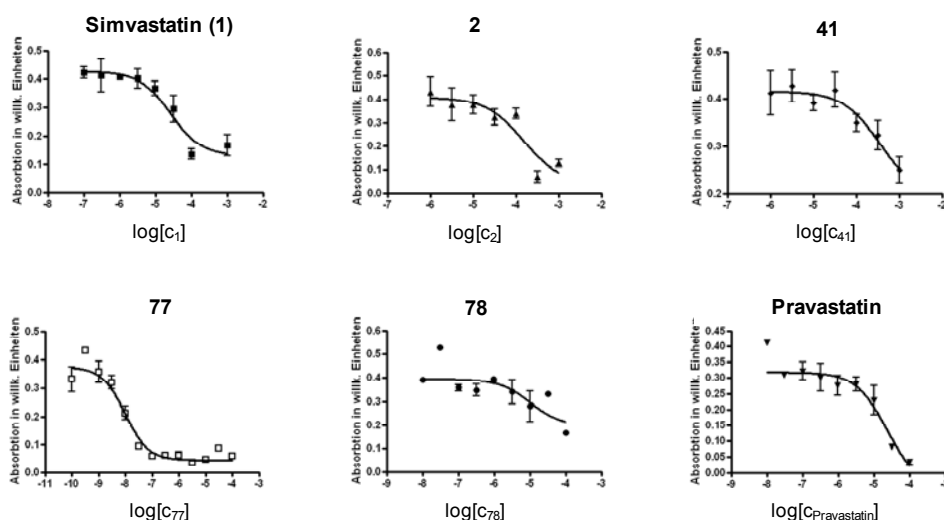
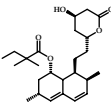
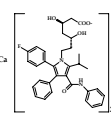
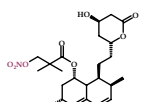
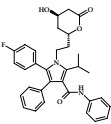
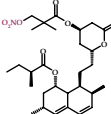
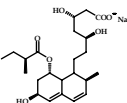


Abb.C2-7 Darstellung der erhaltenen Inhibitionskurven für Simvastatin **1**, das Nitrooxy-Simvastatin-Hybrid **2**, das an der Hydroxylgruppe des Lactonrings nitrato-acylierte Statin-Derivat **41**, das Calcium-Salz von Atorvastatin **77** und das relaxonisierte Atorvastatin-Derivat **78** sowie für Pravastatin

Bei den in Tab.C2-2 dargestellten IC_{50} -Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten, welche mit voneinander unabhängigen Verdünnungsreihen durchgeführt wurden.

Die berechneten IC_{50} -Werte bestätigten größtenteils die jeweilige Aussage, die aus der entsprechenden spezifischen Aktivität getroffen werden kann. Simvastatin **1** und Pravastatin zeigten bei meinen Untersuchungen IC_{50} -Werte in gleicher Größenordnung. Wie oben ausgeführt, führte die Einführung eines organischen Nitrat-Restes an das Simvastatin-Grundgerüst zu einem leicht abgeschwächten inhibitorischen Effekt. Eine Verschiebung des IC_{50} -Wertes hin zu höheren Konzentrationen von 14.9 μ M zu 26.8 μ M verdeutlichte dies (Tab.C2-2).

Tab.C2-2 Darstellung der berechneten IC_{50} -Werte

Verbindung	IC_{50} [μ M]	Verbindung	IC_{50} [μ M]
	1 26.8		77 $9.9 \cdot 10^{-3}$
	2 14.9		78 10.5
	41 36.4		Pravastatin 22.8

Das an der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes nitratoacylierte Lovastatin-Derivat **41** zeigte einen wesentlich höheren IC_{50} -Wert, also eine stark abgeschwächte inhibitorische Wirkung auf die HMG-CoA-Reduktase. Entgegen den zuvor diskutierten Ergebnissen für das Calcium-Salz von Atorvastatin (**77**) und dessen analogem Diol-Derivat (**78**) zeigten die ermittelten IC_{50} -Werte einen deutlichen Unterschied zwischen der aktiven Form **77** und dessen Prodrug **78**.

Das sich bereits in seiner aktiven Form befindende Calcium-Salz des Atorvastatins (**77**) wies mit einem IC_{50} -Wert von $9.9 \cdot 10^{-3}$ μ M unter den gemessenen Statinen und Statin-Derivaten mit Abstand den stärksten inhibitorischen Effekt auf. Hingegen wurde für das relactonisierte Atorvastatin-Derivat (**78**) ein IC_{50} -Wert von 10.5 μ M ermittelt, welcher sich trotz allem noch unter dem des Simvastatin (**1**) mit IC_{50} = 26.8 μ M befindet (Tab.C2-2).

Entgegen der zuvor ermittelten Ergebnisse, bei welchen Simvastatin der potenteste Inhibitor war, zeigte **77** hier den mit Abstand niedrigsten IC_{50} -Wert und somit den höchsten inhibitorischen Effekt auf die HMG-CoA-Reduktase.

C.3 β -Amyloid-Aggregation und deren Inhibition durch Statin-Derivate

Neben dem für die Alzheimer-Krankheit typischen langsamen und kontinuierlich fortschreitenden Verlust von Nervenzellen zeigen *post mortem* Untersuchungen im Gehirn der Erkrankten zwei charakteristische Merkmale: Neurofibrillen innerhalb der Nervenzellen und β -Amyloid-Plaques außerhalb der Neuronen. Hauptbestandteil der extrazellulären Amyloid-Plaques sind die

β -Amyloid-Peptide ($A\beta$) mit einer Länge von 38 bis 42 Aminosäuren (z. B. $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$). Kang *et al.* zeigten, dass diese proteolytische Spaltprodukte des hochmolekularen „Amyloid-Precursor-Proteins“ (APP) sind [Kang, 1987]. APP, ein aus bis zu 770 Aminosäuren bestehendes Protein, wird, wie in Abb.C3-1 in Teilen skizziert und unter A.4.1 genauer beschrieben, durch unterschiedliche Sekretasen prozessiert.

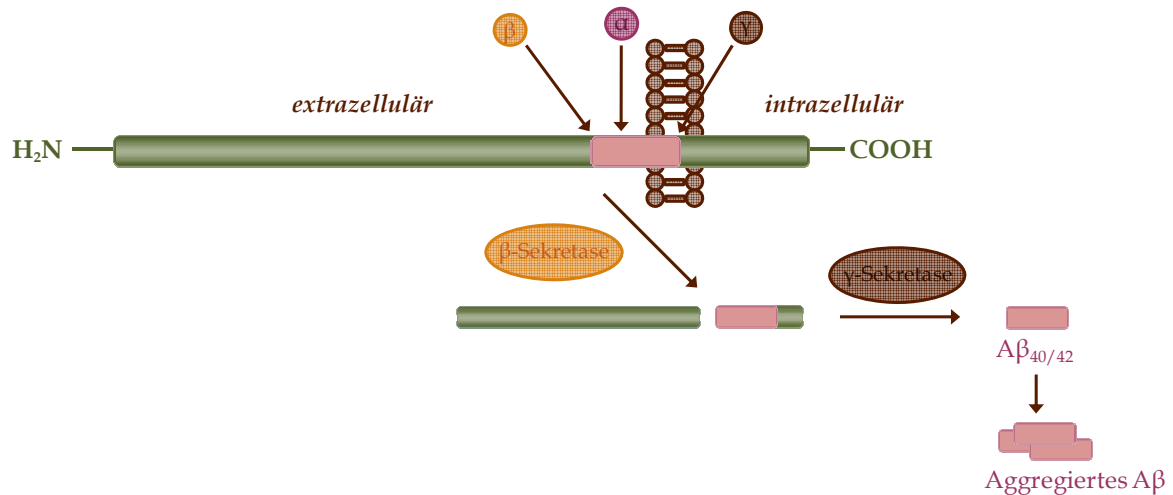


Abb.C3-1 Amyloidogener Abbau von APP und Freisetzung von $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$

Auf dem pathologischen amyloidogenen Weg spaltet die β -Sekretase die Sequenz näher zum N-Terminus von APP, die γ -Sekretase proximal zum C-Terminus. Durch unterschiedliche Spaltstellen der γ -Sekretase werden Protein-Fragmente mit einer Länge von 38 bis 42 Aminosäuren herausgeschnitten und freigesetzt (Abb.C3-1), welche die Tendenz haben, zu toxischen Oligomeren zu reagieren und dann weiter zu Protofibrillen zu aggregieren. Schließlich lagern sie sich als reife, unlösliche Fibrillen mit β -Faltblattstruktur in Aggregaten (Amyloid-Plaques) ab [Golde, 2002; Schmechel, 2003; Xu, 2005].

Der kinetische Verlauf der Amyloid-Bildung lässt sich im Allgemeinen in zwei charakteristische

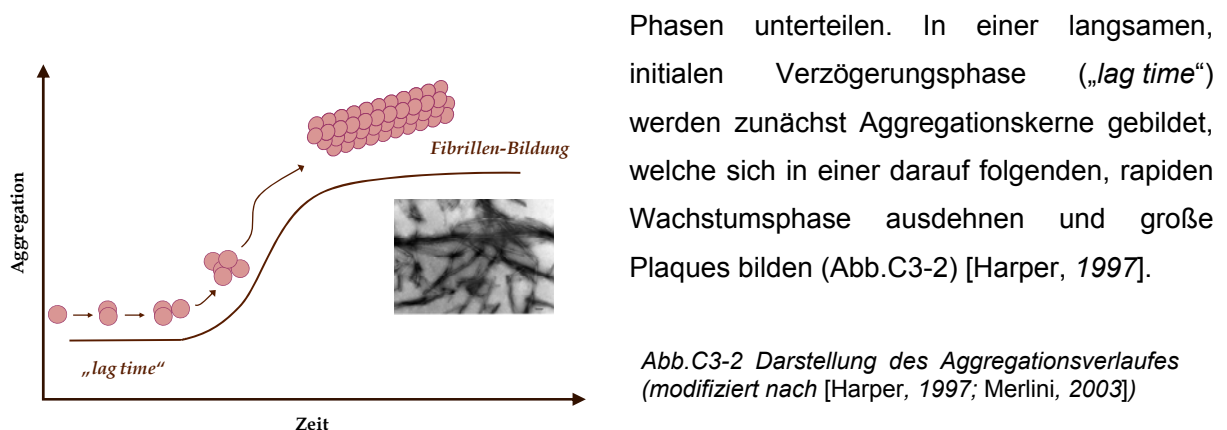


Abb.C3-2 Darstellung des Aggregationsverlaufes (modifiziert nach [Harper, 1997; Merlini, 2003])

Bei dem vorteilhafteren, nichtamyloidogenen Weg spaltet die α -Sekretase das APP innerhalb der $A\beta$ -Sequenz, was die Bildung amyloidogener Peptid-Fragmente ausschließt (vgl. Kap. A.4.1).

Bislang ist noch nicht geklärt, ob und in welchem Ausmaß $A\beta$ -Aggregate oder $A\beta$ selbst den Krankheitsverlauf beeinflussen bzw. neurotoxisch sind. Seit Aufstellung der Amyloid-Kaskaden-

Hypothese nach Hardy und Higgins stehen die Aggregate von β -Amyloid im Verdacht, eine Kaskade auszulösen, die zu der für die Alzheimer-Erkrankung charakteristischen Neurodegeneration führt (vgl. Kap. A.4.1) [Hardy, 1992/2002].

Da verschiedene Studien keine Korrelation zwischen neuronalem Zellverlust und Aggregation im Gehirn Betroffener zeigen konnten, entstanden Zweifel, ob die eigentlichen Amyloid-Plaques Ursache für die A β -bedingte Neurodegeneration sind. Es konnte bislang jedoch nicht widerlegt werden, dass die Oligo- und Polymere von β -Amyloid neurotoxischer sind als die Monomere selbst. Entgegen etlichen Ansätzen, die sich mit der Unterdrückung der Bildung von β -Amyloid beschäftigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Aggregation bereits gebildeter A β -Monomere zu potentiell neurotoxischen Polymeren vermindert werden kann.

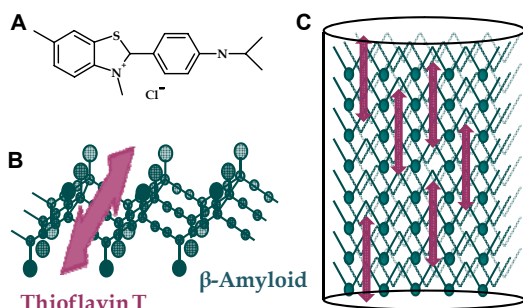
Statine wurden bisher durch ihre sog. pleiotropen Effekte, wie z. B. der Modulation der Cholesterol-Konzentration in *lipid rafts* und dem damit verbundenem Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von A β , als mögliche Alzheimer-Therapeutika diskutiert (vgl. Kap. A.7) [Westmeyer, 2004; Schmechel, 2004; Ostrowski, 2007; Parson, 2007]. Ziel dieser Arbeit war es hingegen, die mögliche Inhibition der Aggregation von monomerem A β_{40} durch Statine zu erforschen. Darüber hinaus sollten Statin-Derivate und Nitrat-Statin-Hybride ebenfalls auf eben diese Wirkung untersucht werden, um zu erkennen, ob und auf welche Weise ein eventuell vorhandener inhibitorischer Effekt der Statine verstärkt werden kann.

C.3.1 Methodenbeschreibung

C.3.1.1 Assay zur Inhibition der A β -Aggregation

Um eine Inhibition der Aggregation messen zu können, wurde ein von Bartolini *et al.* beschriebener Assay (THT-Assay) modifiziert [Bartolini, 2003/2007].

Synthetisch hergestelltes β -Amyloid aggregiert analog zur pathophysiologischen Situation zu Fibrillen mit β -Faltblattstruktur, wie sie auch in den Plaques der Gehirne von Alzheimer-Patienten



gefunden werden [Rochet, 2000]. Die *in vitro* Aggregation von monomeren A β -Molekülen zu Fibrillen lässt sich anhand der Fluoreszenz-Emission des Farbstoffes THT untersuchen.

Abb.C3-3 A) Struktur Thioflavin T; B) Schematische A β -Faltblattstruktur (β -sheets), die Anlagerung von THT zur Faltblattstruktur ist mit einem Pfeil dargestellt; C) Darstellung von eingelagertem THT (modifiziert nach [Krebs, 2005])

THT lagert sich als spezifischer Fibrillenmarker an gebildete Amyloid-Fibrillen an (Abb.C3-3) [Krebs, 2005], so dass dessen Fluoreszenz bei 490 nm vermessen werden kann.

Zunächst wurde nach dem Desaggregationsprotokoll von Klein A β_{40} durch Inkubation mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) in eine einheitliche, nicht fibrilläre Konformation überführt [Klein, 2002]. Der Alkohol HFIP unterbindet hierbei die hydrophoben Wechselwirkungen. Dadurch erhält und konserviert das Peptid zunächst seine monomere Form [Stine, 2003].

Nach der Methode von Bartolini *et al.* und Luo *et al.* wurden die synthetisierten Substanzen mit A β_{40} in Gegenwart von THT bei 37°C inkubiert [Bartolini, 2003; Luo, 2010]. Zur Bestimmung des Blindwertes wurde anstatt der A β_{40} -Lösung ein gleiches Volumen an Puffer-Lösung zugesetzt. Die Bestimmung des Maximalwertes der Aggregation (100%-Wert) wurde analog durchgeführt, wobei die Inhibitor-Lösung durch Puffer-Lösung ersetzt wurde. Aufgrund von Vorversuchen mit kontinuierlichen Messungen konnte der Aggregationsprozess nach 48 h als abgeschlossen betrachtet werden und die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm (λ_{em}) gemessen. Weiterhin wurde eine mögliche Interaktion zwischen Farbstoff und jeweiligem Inhibitor experimentell ausgeschlossen.

Für alle Experimente wurden Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen mit einer Konzentration von 10^{-2} M in DMSO hergestellt und bei -30°C gelagert. Für jeden Experimentansatz wurden neue Verdünnungen in dem Assay-Puffer mit einer Endkonzentration von 10^{-4} M hergestellt.

Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten erfolgte nach Luo *et al.* über die in Abb.C3-4 dargestellte Gleichung, wodurch eine prozentuale Inhibition der Aggregation erhalten wurde [Luo, 2010].

$$I_{Aggregation} = (1 - I_{F_i} / I_{F_c}) \cdot 100\%$$

F_i = gemessene Fluoreszenzintensität mit Inhibitor
 F_c = gemessene Fluoreszenzintensität ohne Inhibitor

Abb.C3-4 Darstellung der theoretischen prozentualen Berechnung der A β -Aggregation

Bei denen im Ergebnisteil angegebenen Werten für die prozentuale Aggregation handelt es sich um gemittelte Werte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

C.3.1.2 Überprüfung der Beständigkeit der Inhibition

In weiteren Experimenten wurde der Versuchsablauf so modifiziert, dass sowohl die Beständigkeit der Inhibition bestätigt als auch der Verlauf der Aggregation aufgezeichnet werden konnte. Zur Erstellung einer Aggregationskurve wurde die Fluoreszenzintensität in Zeitintervallen von 30 min über eine Messdauer von 90 h bestimmt. Die Auswertung der Experimente erfolgte über die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Zeit, wobei Proben gleicher Zusammensetzung gemittelt wurden.

Für Substanzen, welche durch ihren Kurvenverlauf neben der Inhibition der Aggregation ebenfalls ein Hinauszögern der Aggregation zeigten, wurde die *lag time* ermittelt. Hierfür wurde die Kurve jeder einzelnen Probe mit der Software Graph Pad Prism[®], Version 4.0 (GraphPad Software Inc.,

San Diego CA, USA) mit der Einstellung „Fit sigmoide“ anhand der in Abb.C3-5 dargestellten *Boltzmann-Gleichung* und der in Abb.C3-6 dargestellten theoretischen Berechnung für die *lag time* ausgewertet.

$$y = \frac{\text{Bottom} - \text{Top}}{1 - e^{-\frac{(x-x_0)}{dx}}} + \text{Top}$$

Bottom = erreichtes unteres Plateau
 Top = erreichtes oberes Plateau
 dx = Umkehrparameter zum Anstieg
 x = Zeit in [min]
 x₀ = Wendepunkt des Graphen in [min];
 entspricht der halbmaximalen Aggregation

Abb.C3-5 Darstellung der Boltzmann-Gleichung

Die *lag time* berechnet sich aus den Parametern x₀ und 1/dx und ist nach Fändrich ein Maß für die Aggregationsrate. Der Wert für die *lag time* verhält sich somit umgekehrt proportional zum Anstieg und zur Aggregationsrate [Fändrich, 2007].

$$X_{lagtime} = x_0 - 2 / dx$$

dx = Umkehrparameter zum Anstieg
 x₀ = Wendepunkt des Graphen in [min];
 entspricht der halbmaximalen Aggregation

Abb.C3-6 Darstellung der theoretischen Berechnung der lag time

C.3.1.3 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Rifampicin und Clioquinol

Zur Überprüfung des Assays wurden die bereits in der Literatur als aggregationshemmende Wirkstoffe beschriebenen Arzneistoffe Rifampicin und Clioquinol (vgl. Kap. A.9.1) nach der unter Kap. C.3.1.1 beschriebenen Methode vermessen. Clioquinol wurde bereits erfolgreich in Tierversuchen [Cherny, 2001] und klinischen Studien zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit eingesetzt. Der Effekt des als Antibiotikum (früher: Chemotherapeutikum) entwickelten Wirkstoffes Clioquinol beruht in der Fähigkeit, als Chelatbildner Metallionen wie Fe²⁺, aber auch z. B. Zn²⁺ und Cu²⁺, zu binden [Regland, 2001] und diese somit dem biologischen System zu entziehen (vgl. Kap. A.9.1). Wenn Zink- und Kupfer-Ionen mit Aβ interagieren, führt dies zu einer Förderung von Aggregation und Fibrillenbildung [Cherny, 2001]. Insbesondere Zink-Ionen werden von Aβ schon bei physiologischen Konzentrationen mit einer hohen Affinität gebunden, da Aβ eine spezifische Bindungsstelle für dieses Ion besitzt [Bush, 1994]. In Plaques und angrenzenden Hirnregionen von Alzheimer-Patienten wurden erhöhte Zink-Konzentrationen gefunden [Lovell, 1998]. Auch Kupfer-Ionen fördern die Aggregation von Aβ, allerdings werden hierfür in der Literatur leicht saure Bedingungen beschrieben [Atwood, 1998].

C.3.1.4 Elektronenmikroskopie

Um den durch die Fluoreszenzmessungen erkannten Einfluss der Substanzen auf die Amyloid-Aggregation mit einer anderen Methode zu bestätigen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Amyloid-Aggregate angefertigt. Diese ermöglichen das Ausmaß der β-Amyloid-Aggregation sowie die Struktur und Form der gebildeten β-Amyloid-Fibrillen sichtbar zu machen. Die Proben wurden unter den Assay-Bedingungen inkubiert, jedoch wurde den Proben für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen kein Fluoreszenzindikator

zugesetzt. Nach ca. 90 h wurden die Proben zur Negativkontrastierung mit Uranylacetat vorbereitet. Hierzu wurden mit Formvar-Kohle befilmte 400mesh EM-Kupfernetzchen verwendet, die vorher durch 20 Sekunden Glimmentladung hydrophilisiert wurden. Die Kontrastierung wurde nach der „Drei-Tropfen-Technik“ [Nermut, 1973] durchgeführt. Zunächst wurde ein Tropfen Probensuspension 10 min auf einem EM-Netzchen sedimentieren gelassen, dann wurde kurz mit Aq.-bidest. gewaschen und schließlich mit einem Tropfen 2% Uranylacetat in Aq.-bidest. kontrastiert. Das überschüssige Kontrastmittel wurde mit Filterpapier abgesaugt.

Die Untersuchung der Präparate erfolgte gemeinsam mit Dr. Martin Westermann am Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) der Medizinischen Fakultät der FSU-Jena am Transmissionselektronenmikroskop Zeiss-CEM 902A (Auflösung: 0,6 nm). Die Abbildungen wurden mit Hilfe einer TVIPS FastScann CCD-Kamera aufgenommen.

C.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Frühere Versuche, einen stabilen Assay für A β ₄₂ zu etablieren, scheiterten an einer schlechten Löslichkeit des Peptides in HFIP und DMSO. Die im Vergleich zu A β ₄₀ zusätzlich enthaltenen Aminosäuren Isoleucin und Alanin im C-Terminus sollen eine Verschlechterung der Löslichkeit sowie eine schnellere Fibrillen-Bildung bei A β ₄₂ bewirken [Harper, 1997]. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Experimente mit dem kürzeren, etwas langsamer aggregierenden A β ₄₀-Peptid durchgeführt. Dieses wurde von Herrn Marcus Fändrich (Max-Planck-Institut, Halle/Saale) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In Vorversuchen wurde reines A β ₄₀ in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen und die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen. Erwartungsgemäß konnte ein A β ₄₀-konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität bzw. der Fibrillen-Bildung beobachtet werden. Die im Folgenden diskutierten Messungen wurden bei einer Konzentration von 75 μ M an A β ₄₀ sowie einer Konzentration von 100 μ M an Testsubstanz durchgeführt, da sich hier die beste Reproduzierbarkeit zeigte.

C.3.2.1 Untersuchung verschiedener Statine

In einem Projekt der Arbeitsgruppe Fändrich führte Lovastatin in einem Zell-Assay zu einer direkten Inhibition der A β -Aggregation von 35% [Gellermann, 2006]. Bei der Durchführung des Assays wurde lösliches A β ₄₀ mit Monozyten inkubiert und die sich dabei bildenden β -Amyloid-Plaques wurden mit Hilfe von Kongorot in einem Polarisationsmikroskop detektiert.

Um eventuelle Sekundäreffekte der Statine an Monozyten auszuschließen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung der Statine auf die direkte A β ₄₀-Aggregation in einem zellfreien Assay untersucht werden. Erstaunlicherweise zeigte jedoch keines der getesteten Statine unter den gegebenen Assay-Bedingungen einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die direkte A β ₄₀-Aggregation. Weder das Prodrug Simvastatin noch die sich bereits in ihrer aktiven Form befindenden Calcium-Salze von Pravastatin und Atorvastatin führten zu einer deutlich

verminderten Zusammenlagerung der $A\beta_{40}$ -Monomere. Lediglich Lovastatin zeigte eine schwache Minderung der Aggregation auf 85% (Abb.C3-7).

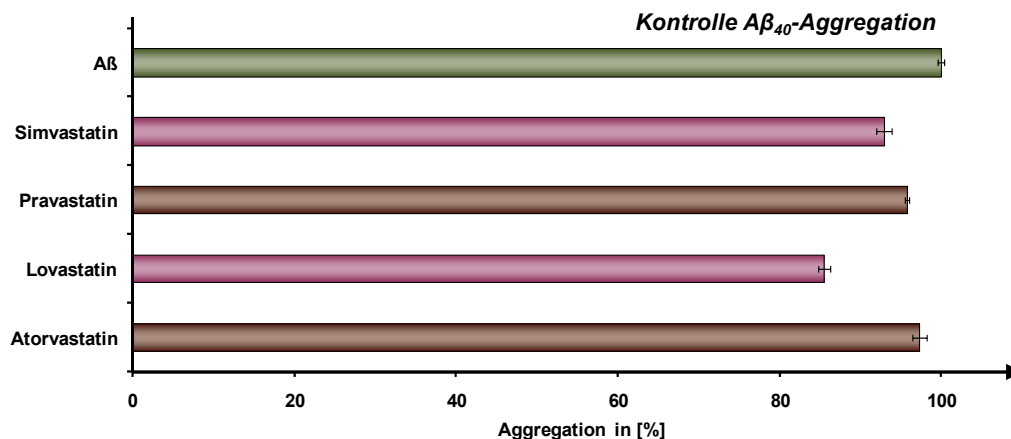


Abb.C3-7 Prozentual berechnete Aggregation der getesteten Statine. Die sich bereits in ihrer aktiven Form befindenden Calcium-Salze von Atorvastatin und Pravastatin sind mit einem braunen Balken und die Prodrugs Simvastatin und Lovastatin mit einem lilafarbenen Balken dargestellt

In dem Bestreben, doch einen inhibitorischen Effekt zu erzielen, wurde die Struktur der Statine gezielt verändert. Da die Struktur der getesteten Prodrugs (Simvastatin (**1**) und Lovastatin (**3**)) nahe legt, dass Eliminierungen der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes durch Dehydratisierungsreaktionen möglich sind, sollten die jeweiligen Eliminierungsprodukte synthetisiert und getestet werden.

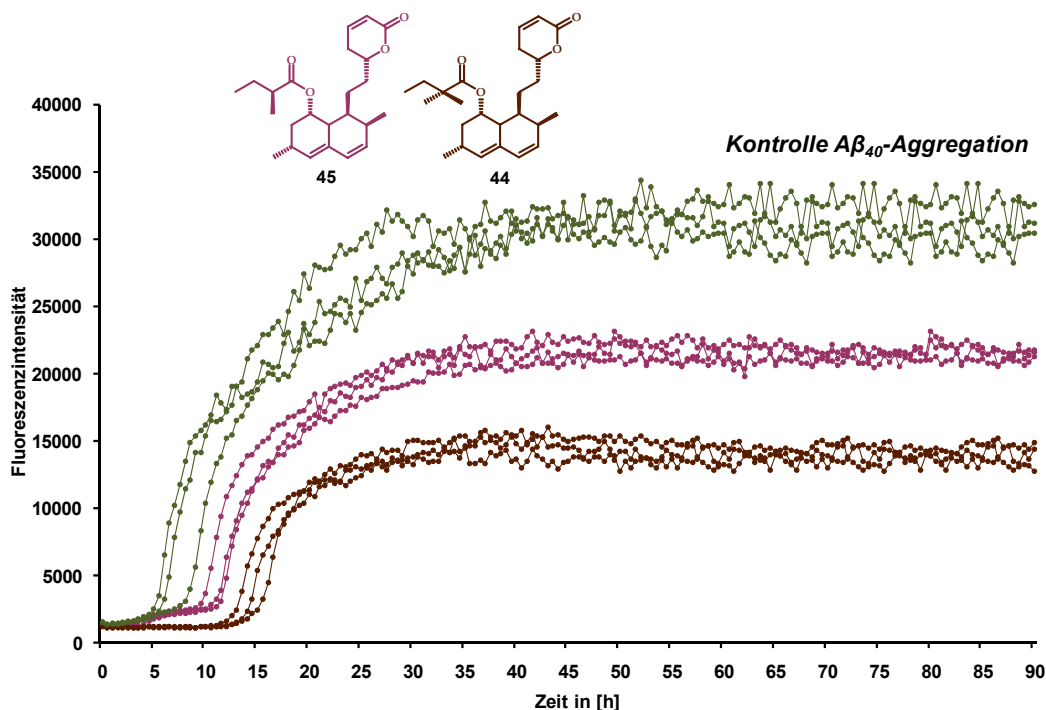


Abb.C3-8 Aggregationskurven von $A\beta_{40}$ ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, und mit Inhibitor **44**, dargestellt in einer braunen Kurvenschar, bzw. mit Inhibitor **45**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Beide Anhydro-Statin-Derivate zeigten nun im Vergleich zu den originären Statinen einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die direkte $A\beta_{40}$ -Aggregation (Abb.C3-8). Hierbei war die inhibitorische Aktivität des Eliminierungsproduktes von Simvastatin (**44**) mit einer Minderung der

Aggregation auf 45% stärker ausgeprägt als die des Lovastatin-Derivates **45** mit einer Aggregationshemmung auf 65% (Abb.C3-9).

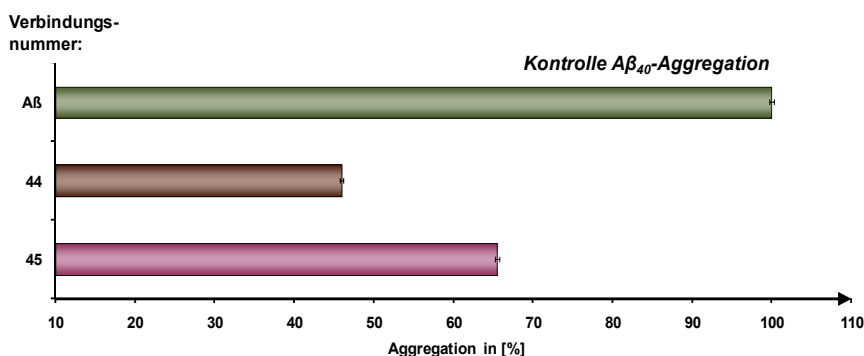


Abb.C3-9 Prozentual berechnete Aggregation des Anhydro-Simvastatin-Derivates **44**, dargestellt mit einem braunen Balken, und des Anhydro-Lovastatin-Derivates **45**, dargestellt mit einem lilafarbenen Balken

Neben einer Verminderung der Aggregation des monomeren β -Amyloides zeigte der Verlauf der Aggregationskurve beider Verbindungen **44** und **45** im Vergleich zu der „reinen“ $A\beta_{40}$ -Kontrolle eine leichte Verzögerung des eigentlichen Aggregationsstarts. Berechnungen der unter Abb.C3-6 (s. S.62) dargestellten *lag time* bestätigten diese Beobachtungen. Auch hier zeigte **44** mit einer Verzögerung des Aggregationsstartes um ca.15 h einen stärker ausgeprägten Effekt als **45** mit einer Verzögerung von 12 h (Abb.C3-9 und Abb.C3-10).

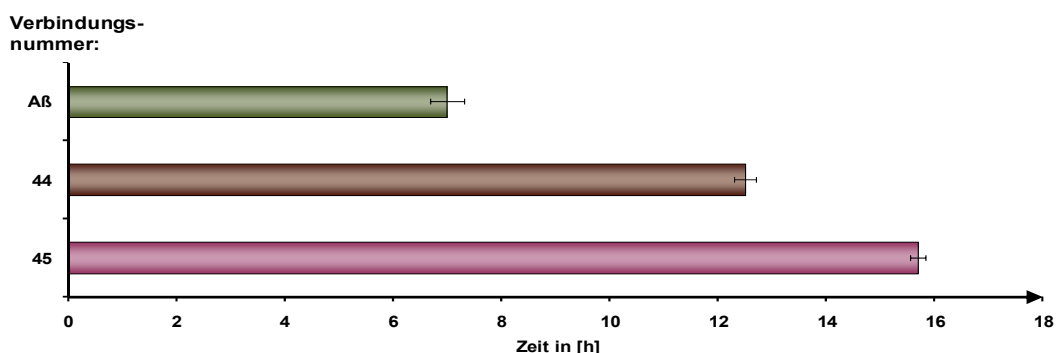


Abb.C3-10 Berechnete Werte für die *lag time* des Anhydro-Simvastatin-Derivates **44**, dargestellt mit einem braunen Balken, und des Anhydro-Lovastatin-Derivates **45**, dargestellt mit einem lilafarbenen Balken

C.3.2.2 Untersuchung verschiedener, an der lactonischen Hydroxylgruppe acylierter Statin-Derivate

Weitergehend wurden nun die Statine **1** und **3** in einer für ihren eigentlichen Wirkmechanismus der HMG-CoA-Reduktase-Inhibition untypischen Weise modifiziert.

Durch Acylierung mit unterschiedlichen Säurechloriden an der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes wurde eine Reihe neuer Simvastatin- und Lovastatin-Derivate erhalten und hinsichtlich ihrer Inhibition der direkten β -Amyloid-Aggregation untersucht (Abb.C3-11).

Wie in Abb.C3-11 dargestellt, zeigte eine Vielzahl der synthetisierten Derivate eine moderate inhibitorische Wirkstärke auf die $A\beta_{40}$ -Aggregation.

Jedoch ließ sich weder durch die Einführung eines Acetyl-Restes noch eines verzweigten 2,2-Dimethylpropanoyl-Restes an die lactonische Hydroxylgruppe eine Minderung der β -Amyloid-Aggregation erzeugen: Beide Simvastatin-Derivate (**51** und **53**) zeigten praktisch keine inhibitorische Wirkpotenz, die Aggregation erfolgte zu 98% bzw. 93%. Ein ähnliches Bild stellte sich bei den analogen Lovastatin-Derivaten mit einer vollständigen Aggregation für **52** und einer vernachlässigbar schwachen Minderung der Aggregation durch **54** auf 90% dar (Abb.C3-11).

Hingegen führte die Acylierung mit Octanoylchlorid sowohl bei dem Simvastatin-Derivat **59** als auch bei dem Lovastatin-Derivat **60** zu einer deutlichen Abschwächung der Aggregation auf 48% bzw. 52%. Erstaunlicherweise führte die Einführung eines 3,5,5-Trimethylhexanoyl-Restes zu einer starken Diversifizierung der inhibitorischen Aktivitäten: So inhibierte das Lovastatin-Derivat **58** um ca 20% effektiver als das analoge Simvastatin-Derivat **57** mit einer Senkung auf 50%. Wie in Abb.C3-11 dargestellt, konnte der stärkste inhibitorische Effekt durch die Einführung eines 2,2-Dimethylbutanoyl-Restes an das Simvastatin-Grundgerüst (**55**) mit einer auf 48% geminderten Aggregation erzielt werden. Ebenfalls zeigte das 2,2-Dimethylbutanoyl-Lovastatin-Derivat **56** eine ähnlich starke Wirkaktivität mit einer Inhibition der Aggregation auf 50% (Abb.C3-11).

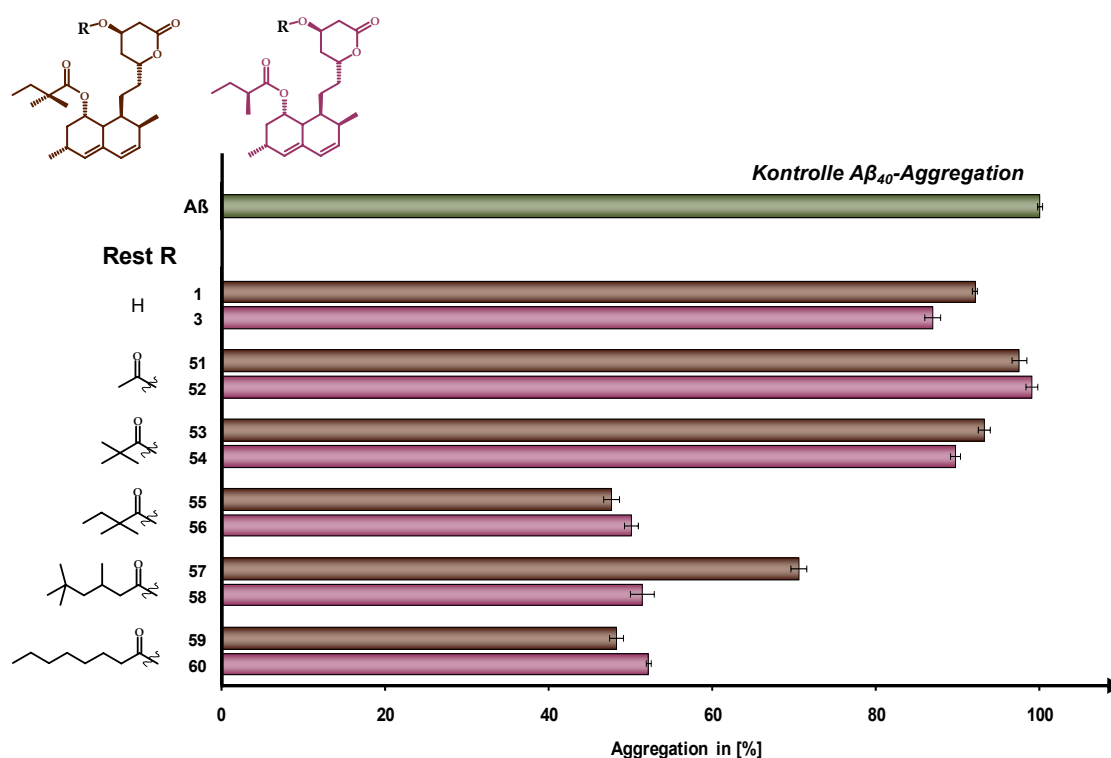


Abb.C3-11 Prozentual berechnete Aggregationswerte. Zur besseren Übersicht der Ergebnisse sind alle Lovastatin-Derivate mit einem lilafarbenen Balken und alle Simvastatin-Derivate mit einem grünen Balken dargestellt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Länge und Verzweigung der Acylkette einen entscheidenden Einfluss auf den inhibitorischen Effekt haben. Darüber hinaus lässt sich vermuten, dass die inhibitorische Wirkaktivität der Verbindungen nicht an einzelne

Strukturelemente, sondern vielmehr an ein Zusammenspiel dieser und somit an die Gesamtstruktur der Verbindung gebunden ist.

C.3.2.3 Untersuchung verschiedener Nitrat-Statin-Hybride

Wie bereits unter A.8 diskutiert, gewinnen NO-gebende Hybridstrukturen, d. h. molekulare Vereinigungen von NO-Donoren, wie z. B. einer Nitratfunktion, mit andersartigen bioaktiven Strukturen, an Bedeutung und werden auch mit dem Augenmerk auf mögliche Alzheimer-Therapeutika entwickelt und untersucht [Thatcher 2005/2006; Fang, 2008b]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Statine z. B. bei kardiovaskulären Erkrankungen die natürliche NO-Produktion stimulieren [Trochu, 2003].

Vor diesem Hintergrund entstand die Überlegung, den inhibitorischen Effekt auf die direkte A β ₄₀-Aggregation durch das zusätzliche Einfügen einer Nitratfunktion in das bereits modifizierte Statin, also durch die Konstruktion von Nitrat-Statin-Hybriden, noch zu verstärken.

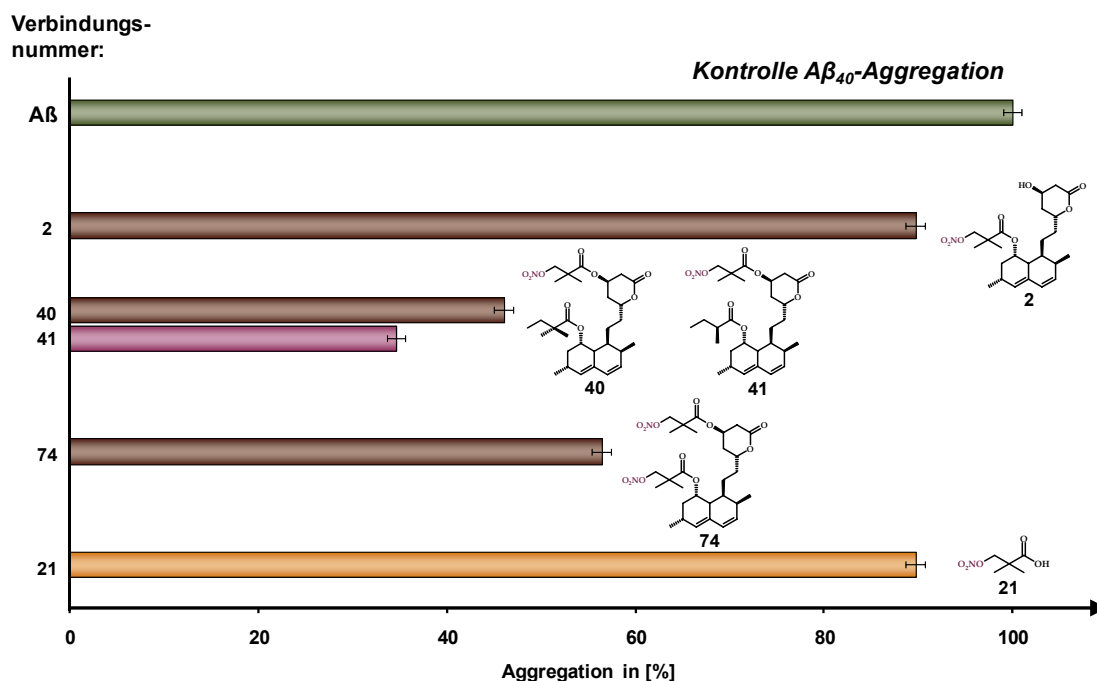


Abb.C3-12 Prozentual berechnete Aggregationswerte aller Nitrat-tragenden Statin-Derivate sowie des verwendeten Acylierungsmittels (21). Zur besseren Übersicht der Ergebnisse sind alle Simvastatin-Derivate mit einem braunen Balken, das Lovastatin-Derivat mit einem lilafarbenen Balken und das Acylierungsmittel mit einem gelben Balken dargestellt.

Hierbei zeigten sich überraschende Ergebnisse: Das nitratoacylierte Simvastatin-Derivat 2, bei welchem der Nitrat-Rest ohne *spacer* an die Grundstruktur von Simvastatin gebunden ist, zeigte analog seiner Leitstruktur 1 einen vernachlässigbar kleinen inhibitorischen Effekt auf die direkte A β ₄₀-Aggregation mit einer nahezu vollständigen Aggregation von 90%. Jedoch führte auch hier eine Nitratoacylierung an der Hydroxylgruppe des Lovastatin-Lacton-Ringes (41), obwohl diese, wie bereits erwähnt, für die Substanzklasse der Statine strukturell eher untypisch ist, zu einer Aggregationsminderung auf bemerkenswerte 35% (Abb.C3-12 und Abb.C3-13). Das analoge nitratoacylierte Simvastatin-Derivat 40 minderte die Aggregation auf 46%, also etwas weniger

deutlich als das hochpotente **41** (Abb.C3-12). Diese Ergebnisse lassen spekulieren, dass der organische Nitrat-Rest an dem Target der Amyloidaggregations-Inhibition einen mechanistischen Beitrag leistet. Mit der Absicht, den durch Derivat **41** hervorgerufenen inhibitorischen Effekt noch zu verstärken, wurde ein Dinitrat-Statin-Hybrid (**74**) synthetisiert und auf die direkte β -Amyloid-Aggregation getestet. Enttäuschenderweise zeigte sich keine Aktivitätssteigerung, die Substanz **74** reduzierte die Aggregation lediglich auf 56% (Abb.C3-12). Ebenso ließ sich durch das Acylierungsmittel, die 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (**21**), keine deutliche Minderung der Aggregation erzeugen. Dies bestärkt die Hypothese, dass der inhibitorische Effekt der Statin-Derivate nicht an einzelne Strukturelemente, sondern vielmehr an ein Zusammenspiel dieser gebunden zu sein scheint.

Alle Aggregationskurven ergaben ein überwiegend einheitliches, charakteristisches Bild. Nach einer *lag time* (vgl. Abb.C3-2, S.59) kommt es zu einer steigenden Aggregation, bis sich schließlich ein „Aggregationsplateau“ bildet, welches bis zu dem Versuchsende (nach 90 h) beständig bleibt. Dies ist in Abb.C3-13 beispielhaft für das wirkstärkste Statin-Derivat **41** dargestellt. Der Vergleich des erhaltenen Aggregationsplateaus von **41** zu der maximalen Aggregation im Kontrollversuch (reines $A\beta_{40}$, ohne Inhibitor) verdeutlicht die verminderte Zusammenlagerung der monomeren $A\beta_{40}$ -Moleküle durch den Inhibitor.

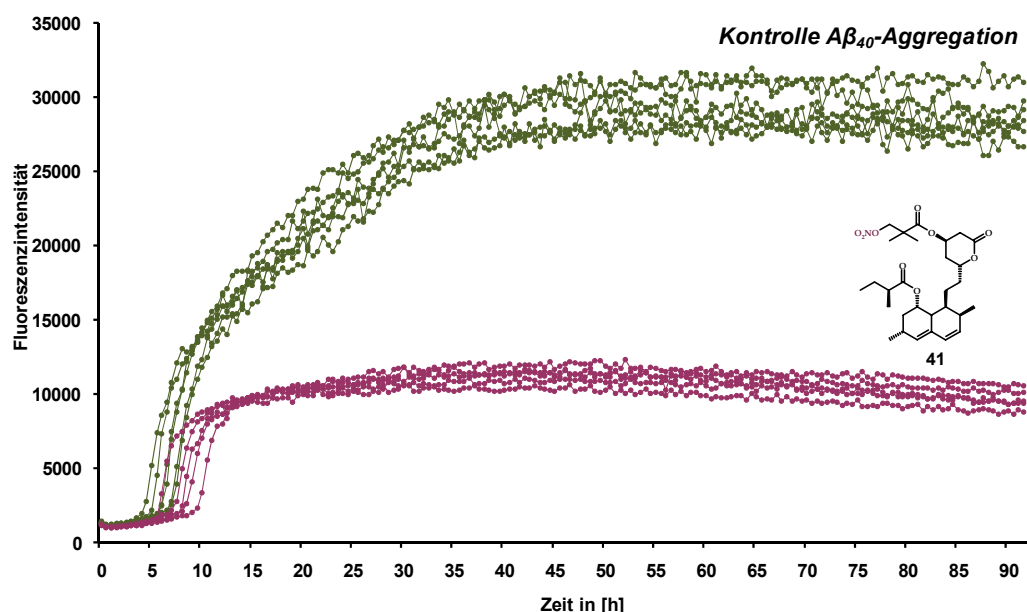
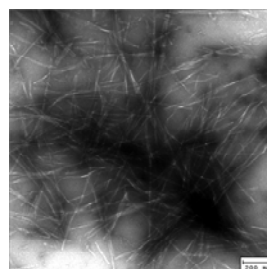
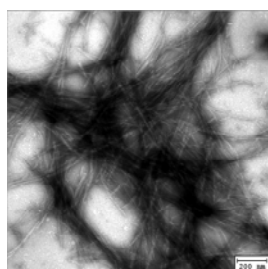


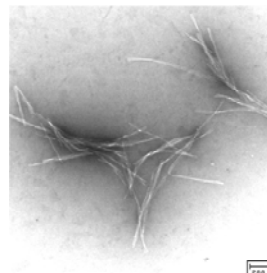
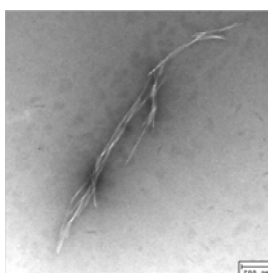
Abb.C3-13 Aggregationskurven von $A\beta_{40}$ ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, und mit Inhibitor **41**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Um den durch die Fluoreszenzmessungen erkannten deutlichen Einfluss der Nitrat-Statin-Derivate auf die Amyloid-Aggregation auf andere Weise zu belegen, wurden die erhaltenen Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Negativkontrastierung, wie unter Kap. C.3.1.4 beschrieben, bestätigt. Auch hier wiesen Proben, die 90 h mit den Inhibitoren **41** bzw. **74** behandelt worden waren, eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben stark reduzierte $A\beta_{40}$ -Aggregation auf (Abb.C3-14), was wiederum eine verminderte Plaquebildung in Aussicht stellt.

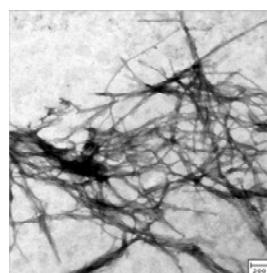
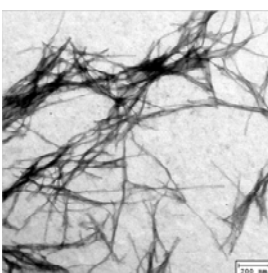
Bei der Inkubation von reinem A β ₄₀ zeigten sich nach 90 h sowohl eine umfangreiche spontane Fibrillen-Bildung mit einer klaren Morphologie als auch eine ausgeprägte Zusammenlagerung der Fibrillen zu Aggregaten (Abb.C3-14). Dahingegen führte die Zugabe von Inhibitor **41** zu einer deutlich geminderten Fibrillenbildung, und es zeigten sich kaum fibrilläre Aggregate. Die Probe wies lediglich einzelne längere, sehr feine Fasern auf. Die Inkubation mit dem etwas schwächeren Aggregationshemmer **74** (vgl. Abb.C3-12, S.67) zeigte dementsprechend eine etwas ausgeprägtere, wenn auch immer noch gegenüber der Kontrolle stark verminderte Fibrillen-Bildung sowie einen geringen Anteil fibrillärer Aggregate. Die Probe war von einem Netzwerk sehr feiner, klar definierter, langer Fibrillen durchzogen (Abb.C3-14).



75 μ M A β ₄₀ (mit DMSO)



75 μ M A β ₄₀ + **41** (Verhältnis 3:4) (mit DMSO)



75 μ M A β ₄₀ + **74** (Verhältnis 3:4) (mit DMSO)

Abb.C3-14 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von A β ₄₀ mit bzw. ohne die Inhibitoren **41** und **74**

C.3.2.4 Untersuchungen zur Stabilität während der Versuchsdurchführung

Um auszuschließen, dass sich die zuvor diskutierten Eliminierungsprodukte **44** und **45** (vgl. Kap. C.3.2.1) während der Versuchsdurchführung ergebnisverfälschend bildeten, wurden alle inhibitorisch potenten Verbindungen zunächst über einen Zeitraum von 90 h in dem Assay-Puffer bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und anschließend (nach der unter Kap. C.3.1.1

beschriebenen Methode) im Vergleich mit frisch hergestellten Proben vermessen. Hierbei ergaben sich praktisch identische Ergebnisse. So bewirkte die lange Vorinkubation (Stabilitätstest) z. B. bei der wirkstärksten Verbindung **41** nur eine sehr geringe Abschwächung der inhibitorischen Aktivität (Abb.C3-15). Ein Vergleich der Aggregationskurven deutete nicht auf die Bildung des Eliminierungsproduktes **45** hin. In einem weiteren Experiment wurde **41** unter den soeben beschriebenen Bedingungen erneut für 90 h inkubiert und anschließend in DMSO regeneriert. Eine Struktursicherung mittels NMR-Daten bestätigte, dass kein Eliminierungsprodukt isoliert wurde.

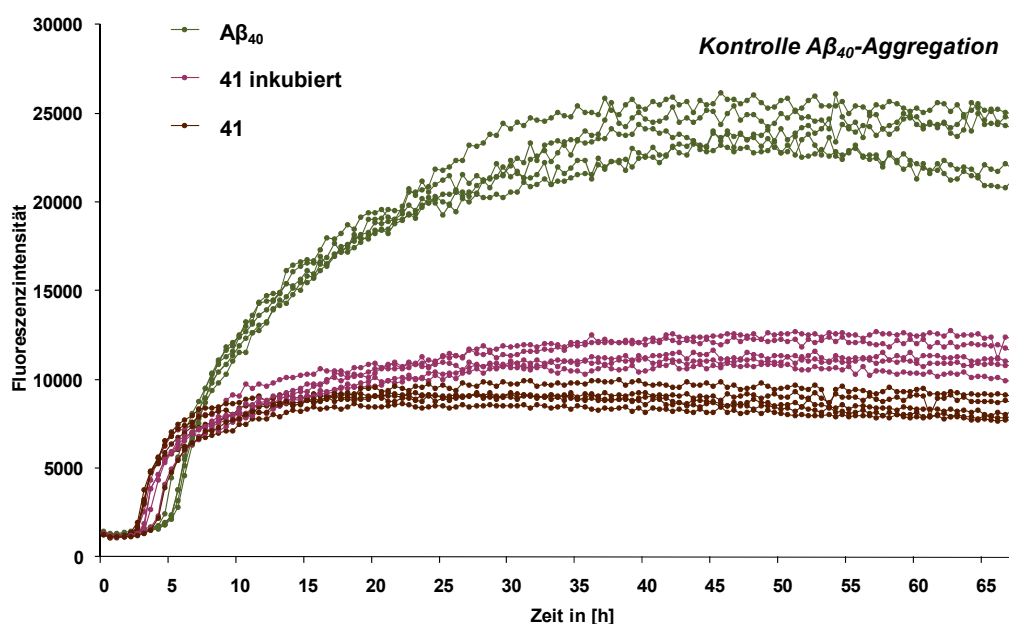


Abb.C3-15 Aggregationskurven von Aβ₄₀ ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, und mit Inhibitor **41**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar, sowie mit dem für 90 h inkubierten Inhibitor **41**, dargestellt in einer braunen Kurvenschar

Wie bereits erwähnt, wurde eine verfälschende Interaktion zwischen Inhibitor und Farbstoff bei jeder Versuchsdurchführung experimentell ausgeschlossen.

C.3.2.5 Untersuchung weiterer Statin-Derivate

Auch die während der verschiedenen Synthesen erhaltenen Vorstufen wurden hinsichtlich einer möglichen inhibitorischen Aktivität auf die direkte β-Amyloid-Aggregation untersucht. Hierdurch sollte getestet werden, ob einzelne „Bausteine“ der Statin-Derivate möglicherweise schon einen inhibitorischen Effekt ausüben.

Das lactonische Diol **15** wies keinerlei Aggregationshemmung (99%) auf, der Silylether **16** jedoch einen mäßigen Effekt mit einer Minderung der Aβ₄₀-Aggregation auf 68% (Abb.C3-16).

Um den Einfluss der Esterkette in 8'-Position des teilhydrierten Naphthalen-Grundgerüsts zu untersuchen, wurde das nur an der lactonischen Hydroxylgruppe acylierte Derivat **76** auf eine mögliche Inhibition untersucht. Auch hier konnten keine deutlichen Effekte auf die Aggregation festgestellt werden (Abb.C3-16).

Durch Acylierung von **15** mit 2,2-Dimethylpropanoylchlorid zu dem Dipivaloyl-Statin-Derivat **75** konnte ebenfalls kein effektiver Aggregationshemmer erhalten werden (Abb.C3-16).

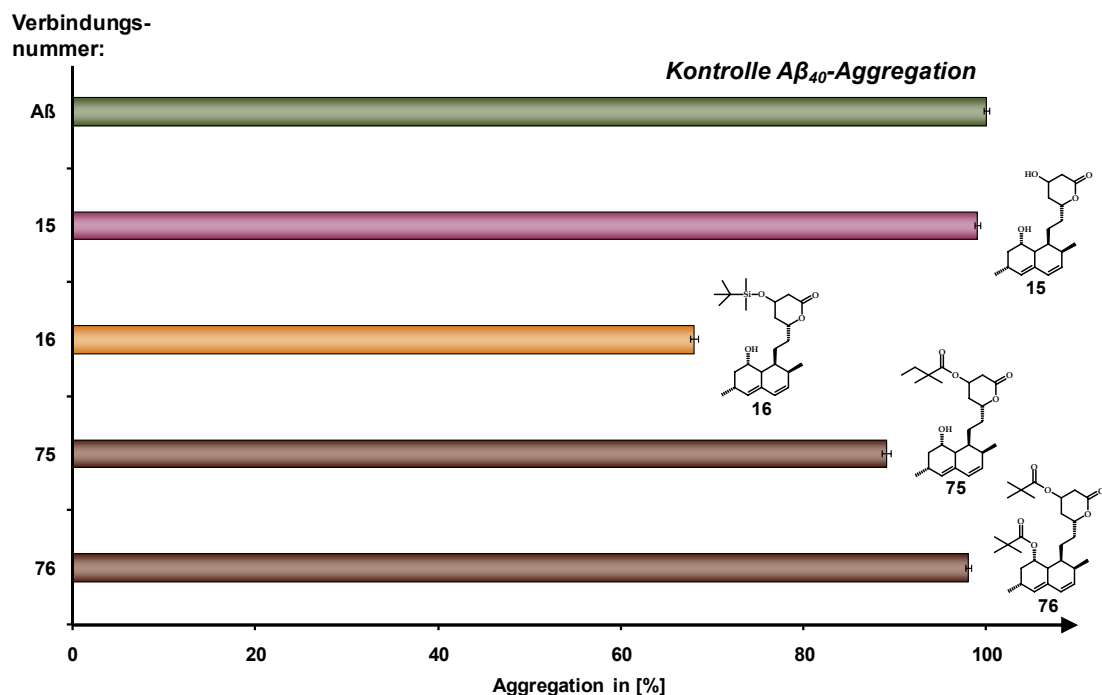


Abb.C3-16 Prozentual berechnete Aggregationswerte der Vorstufen **15**, dargestellt mit einem lilafarbenen Balken und **16**, dargestellt in einem gelben Balken sowie des nur an der lactonischen Hydroxylgruppe acylierten Derivates **75** und des Dipivaloyl-Derivates **76**, dargestellt in braunen Balken

C.3.2.6 Untersuchung von 3-Hydroxy- γ -butyrolacton

Um weitere Kenntnisse über mögliche aggregationshemmende Strukturelemente zu erlangen, sollte der Einfluss des Hexahydronaphthalen-Grundgerüsts sowie der Statin-Seitenkette untersucht werden und gleichzeitig ein Eindruck zur Relevanz der Hydroxyl-Lacton-Ringgröße gewonnen werden. Hierzu wurden 3-Hydroxy- γ -butyrolacton (**82**) und dessen acyliertes Derivat **84** auf ihre inhibitorischen Effekte untersucht. Keine der beiden getesteten Substanzen führte zu einer verminderten A β ₄₀-Aggregation (Abb.C3-17) oder einer Verzögerung des Aggregationsstartes.

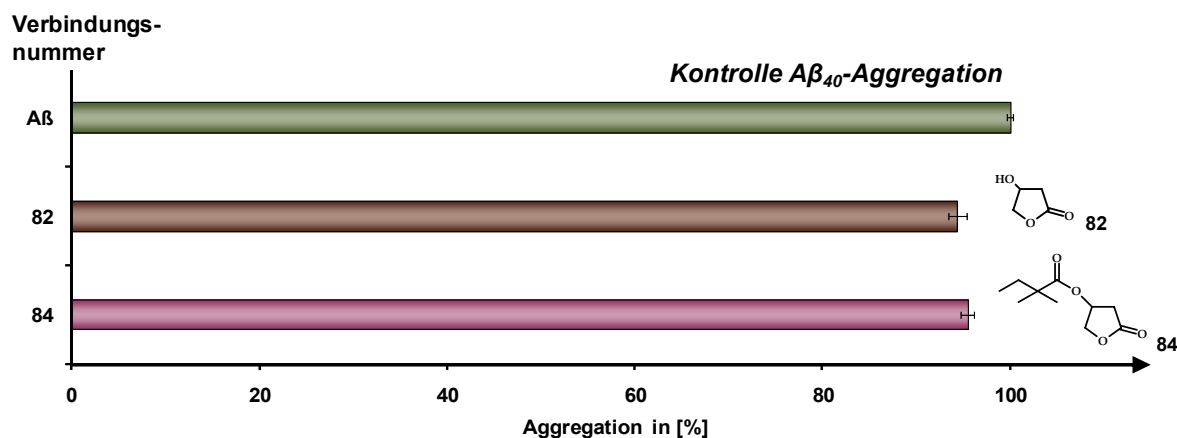


Abb.C3-17 Prozentual berechnete Aggregationswerte des 3-Hydroxy- γ -butyrolactons (**82**), dargestellt mit einem braunen Balken, sowie dessen acylierten Derivates **84**, dargestellt mit einem lilafarbenen Balken

C.3.2.7 Untersuchungen von Rifampicin und Clioquinol

Rifampicin

Wie in der Zielstellung dargestellt (vgl. Kap. A.10.6), wurden die in der Literatur bereits als aggregationshemmende Wirkstoffe beschriebenen Arzneistoffe Rifampicin und Clioquinol (vgl. Kap. A.9.1) [Tomiya, 1994/1996; Cherny, 2001] zur Überprüfung des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Amyloid-Assays unter analogen Versuchsbedingungen vermessen.

In Übereinstimmung mit der für Rifampicin in der Literatur beschriebenen Verhinderung der Aggregation bzw. Fibrillenbildung zeigte Rifampicin eine Minderung der direkten $A\beta_{40}$ -Aggregation auf 20% (Abb.C3-18). Aufzeichnungen der Aggregationskurve bestätigten diese Ergebnisse und zeigten darüber hinaus eine hohe Beständigkeit der Aggregationshemmung. Auch hier wurde eine Interaktion zwischen Farbstoff und Inhibitor experimentell ausgeschlossen.

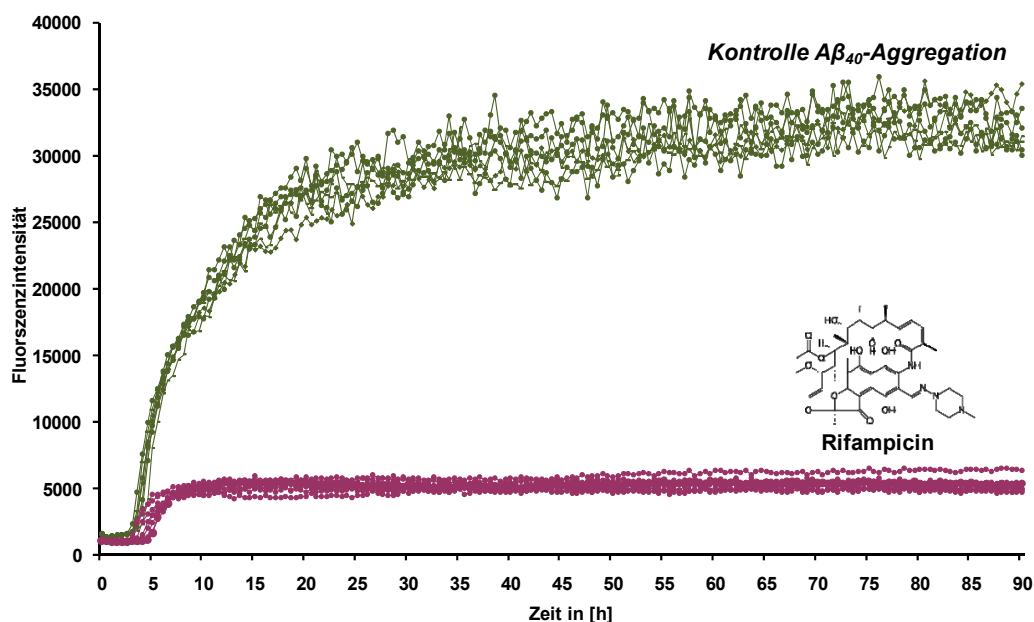
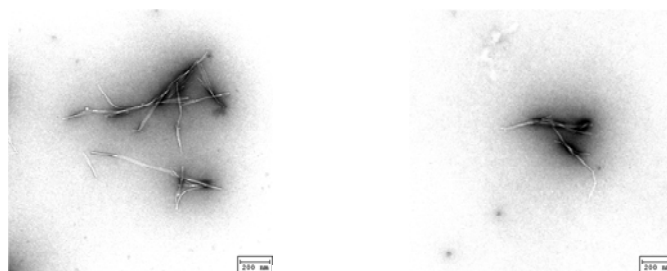


Abb.C3-18 Aggregationskurven von $A\beta_{40}$ ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, sowie mit Inhibitor **Rifampicin**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe (vgl. Abb.C3-14, S.69) stark reduzierte $A\beta_{40}$ -Aggregation durch den Inhibitor Rifampicin.



75 μM $A\beta_{40}$ + Rifampicin (Verhältnis 3:4) (mit DMSO)

Abb.C3-19 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $A\beta_{40}$ mit Inhibitor **Rifampicin**.

Die Probe zeigte lediglich vereinzelt lockere Gruppierungen sehr feiner, kurzer Fibrillen und kaum einen Anteil fibrillärer Aggregate (Abb.C3-19). Im Vergleich zeigt das wirkstärkste Nitrat-Lovastatin-Derivat **41** (Abb.C3-14, S.69) hinsichtlich der Intensität der Aggregation ein ähnliches Bild, jedoch scheint die Inhibition durch Rifampicin zu der Bildung kürzerer Fasern zu führen (Abb.C3-19).

Clioquinol

Clioquinol (**79**) besitzt, wie unter Kap. C.3.1.3 erläutert, die Fähigkeit, Zink- und Kupfer-Ionen zu chelatisieren [Regland, 2001]. Wenn diese Ionen mit A β -Amyloid interagieren, fördert dies dessen rasche Aggregation und Fibrillenbildung [Cherny, 2001]. Vor der Untersuchung von **79** wurde zunächst der tatsächliche Einfluss der beiden Metallionen auf den Aggregationsverlauf von „reinem“ A β_{40} im gewählten Assay analysiert (Abb.C3-20). Hierzu wurde, wie unter Kap. F.4 genauer beschrieben, monomeres A β_{40} mit dem jeweiligen Ion in einer Konzentration von 20 μ M in Phosphatpuffer-Lösung inkubiert und unter analogen Bedingungen vermessen.

Reines A β_{40} ohne Zusatz von Metallionen zeigte eine langsam fortschreitende Aggregation mit einem Aggregationsmaximum nach ca. 35 h (Abb.C3-20). Erwartungsgemäß führte der Zusatz von Zink-Ionen (Zn^{2+} aus $ZnCl_2$) zu einer Aggregationsförderung. Nach einem kurzen Hinauszögern der Aggregation um ca. 10 h nahm diese rapide zu und erreichte ihr Maximum bereits nach weiteren 10 h. Der Zusatz von Kupfer-Ionen (Cu^{2+} aus $CuCl_2$) zu dem System scheint die Aggregation hingegen überraschenderweise zu hemmen, das Aggregationsplateau der Cu^{2+} -induzierten Aggregation liegt deutlich unter der Kontrolle (Abb.C3-20).

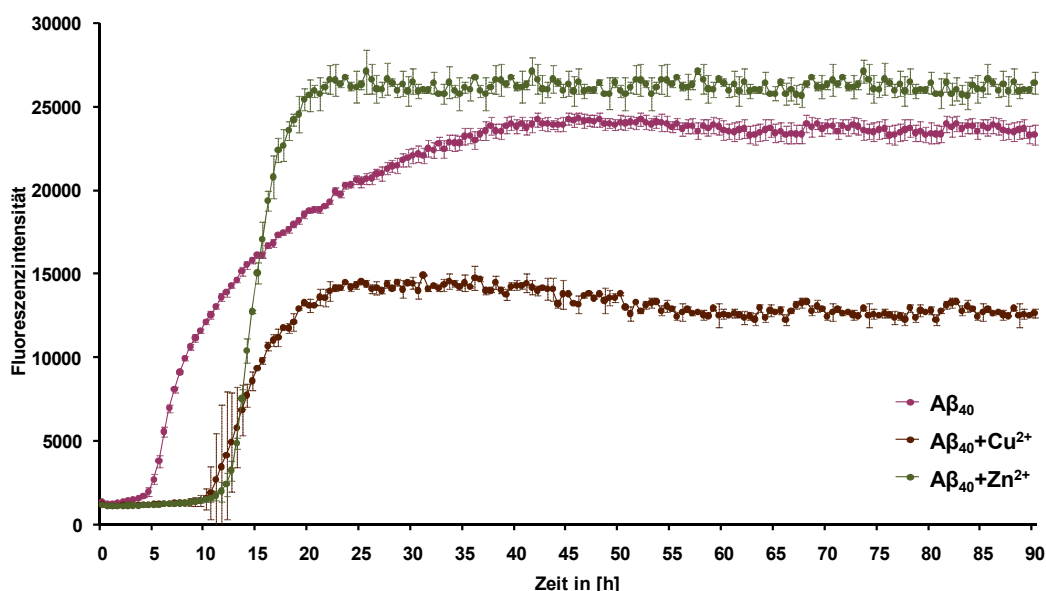


Abb.C3-20 Aggregationskurven von A β_{40} ohne Zusatz von Metallionen, dargestellt in einer grünen Kurve, und von A β_{40} mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen, dargestellt in einer lilafarbenen Kurve, sowie A β_{40} mit Zusatz von Cu^{2+} -Ionen, dargestellt in einer braunen Kurve

Eine Erklärung für die ausbleibende Aggregationsförderung findet sich möglicherweise in dem unter den Assay-Bedingungen bestehenden pH-Wert von 8.0. In der Literatur wird ein

aggregationsfördernder Effekt von Kupfer-Ionen im „leicht Sauer“ (pH 6.8-7.0) beschrieben [Atwood, 1998].

Erste Testungen von **79** ohne Zusatz von Zink-Ionen führten, wie unter Abb.C3-21 dargestellt, zu einer vernachlässigbar kleinen Inhibition auf die direkte A β_{40} -Aggregation von 14%.

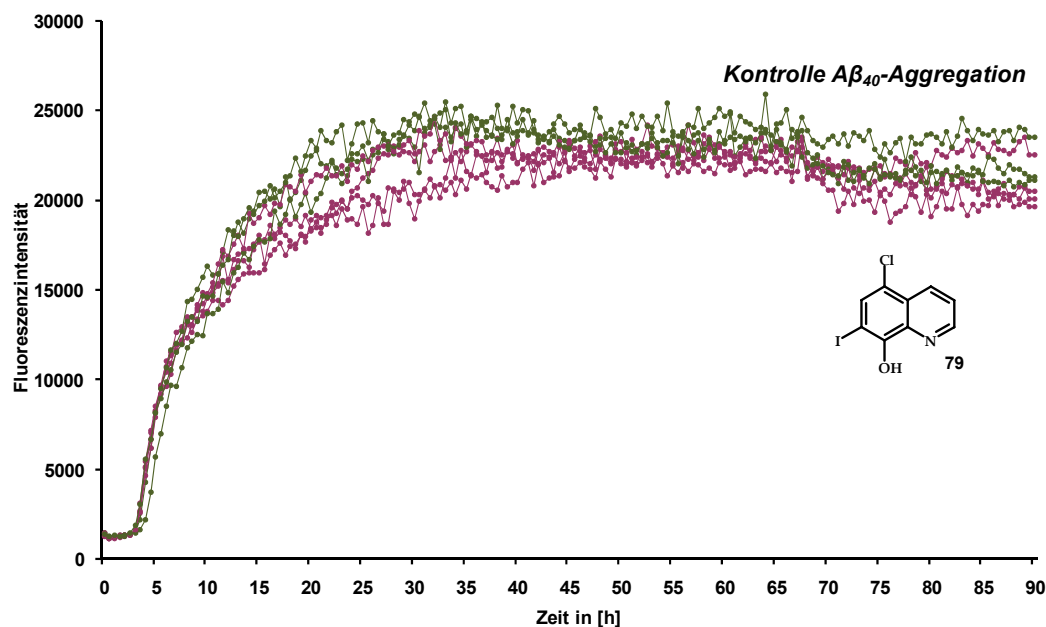


Abb.C3-21 Aggregationskurven von A β_{40} ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, und mit Inhibitor **79**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Jedoch konnte durch Zugabe von Zn²⁺-Ionen und **79** sowohl eine drastische Senkung der Aggregation auf 22% als auch eine Verzögerung der Aggregation um ca. 12 h im Vergleich zu der mit Zink-Ionen induzierten unbehandelten A β_{40} -Kontrolle hervorgerufen werden (Abb.C3-22).

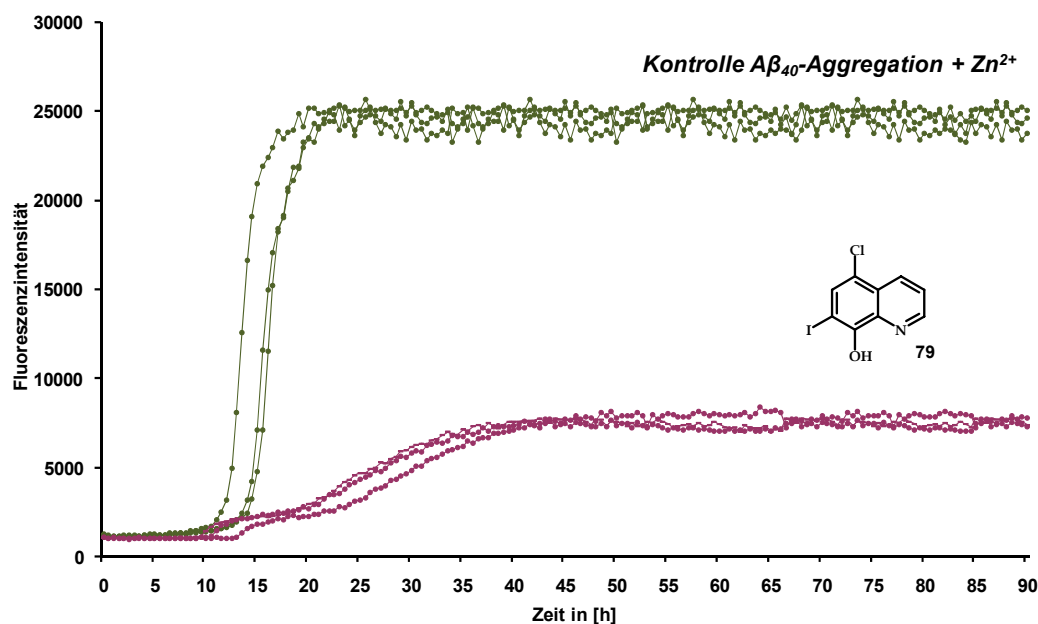
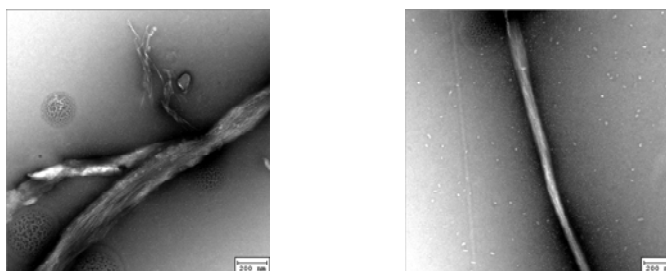


Abb.C3-22 Aggregationskurven von A β_{40} mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, sowie von A β_{40} mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen und mit Inhibitor **79**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die inhibitorische Aktivität von **79** an die Anwesenheit von Zink-Ionen gebunden ist (Abb.C3-22 und zusammengefasst in Abb.C3-28, S.78) oder es ist zu spekulieren, dass das eigentliche inhibitorische Agens des Clioquinols der Clioquinol-Zink-Komplex ist.

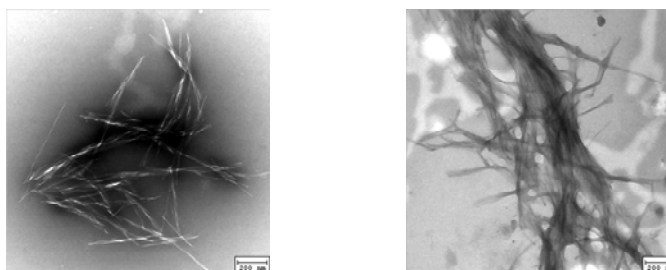
Auch hier konnten die inhibitorischen Wirkaktivitäten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Die Zugabe von **79** führte im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb.C3-14, S.69) zu einem abweichenden Bild mit einer bisher nicht beobachteten Fibrillenmorphologie. Die Probe wies eine hohe Anzahl an einheitlichen Fibrillen auf, welche sich zu einem langen, dicht geordneten, bündelartigen Aggregat zusammenlagerten (Abb.C-23).



75 μM $\text{A}\beta_{40}$ + **79** (Verhältnis 3:4) (mit DMSO)

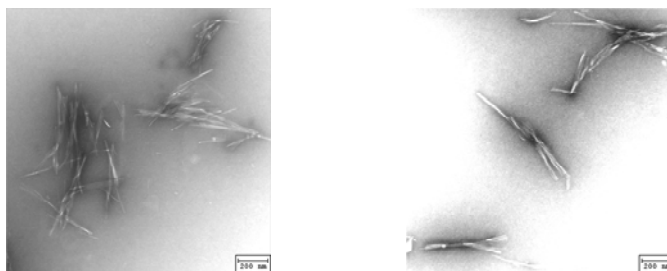
Abb.C3-23 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\text{A}\beta_{40}$ mit Inhibitor **79** ohne Zusatz von Metallionen

Bei der Inkubation von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zn^{2+} -Ionen zeigte sich eine ausgeprägte Fibrillen-Bildung. Die Probe war von einem Netzwerk feiner, klar definierter, hauptsächlich langer Fibrillen überzogen, welche zu Bündeln mit einer längs orientierten Ausrichtung aggregierten (Abb.C3-24). Die Inkubation von **79** und $\text{A}\beta_{40}$ mit Zn^{2+} -Ionen zeigte im Vergleich zu der Kontrollprobe eine deutlich verminderte Fibrillen-Bildung. Die Probe wies hauptsächlich sehr feine, wenig ausgeprägte filigrane Fibrillen auf, welche sich vereinzelt zu lockeren Grüppchen zusammenfanden (Abb.C3-24 (Fortsetzung), S.76).



75 μM $\text{A}\beta_{40}$ + Zn^{2+} -Ionen (mit DMSO)

Abb.C3-24 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen (20 μM) sowie von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen (20 μM) und Inhibitor **79**



75 μM $\text{A}\beta_{40}$ + Zn^{2+} -Ionen + **79** (Verhältnis 3:4) (in DMSO)

Abb.C3-24 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen (20 μM) sowie von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen (20 μM) und Inhibitor **79** (Fortsetzung)

Der Zusatz von Kupfer-Ionen führte, wie unter Abb.C3-20 (S.73) dargestellt, im Vergleich zu der „reinen“ $\text{A}\beta_{40}$ -Kontrolle zu einer Minderung der Aggregation auf 61%. Jedoch zeigte sich hier durch **79** weder eine verstärkte Hemmung über die Kupfer-induzierte Minderung der Aggregation hinaus noch ein Hinauszögern der Aggregation (zusammengefasst in Abb.C3-28, S.78 und Abb.C3-29, S.79).

Unerwartete und nicht vollständig erklärbare Ergebnisse zeigten sich auch bei den Untersuchungen der Clioquinol-Derivate. Die nitratoacylierte Verbindung **80**, die keine chelatbildende freie phenolische Funktion aufweist, führte bereits ohne Zusatz von Metallionen zu einer moderaten Minderung der Aggregation auf 54%. Durch den Zusatz von Zink-Ionen ließ sich diese jedoch zu einer bemerkenswerten Inhibition der $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation auf 16% (Abb.C3-25) sowie einer starken Verzögerung der Aggregation um ca. 28 h verstärken (zusammengefasst in Abb.C3-29, S.79).

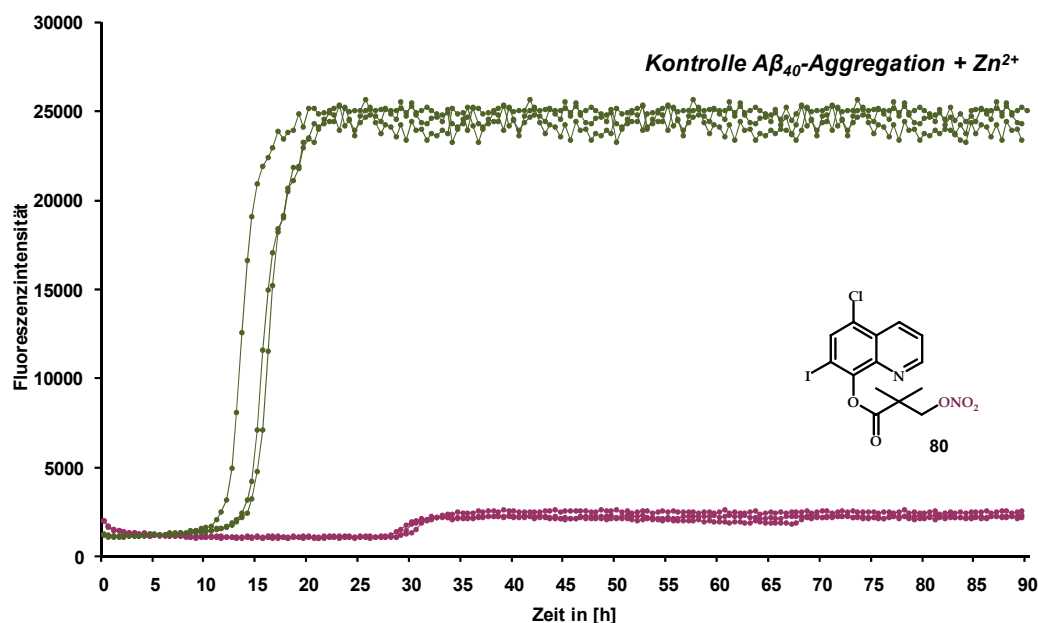
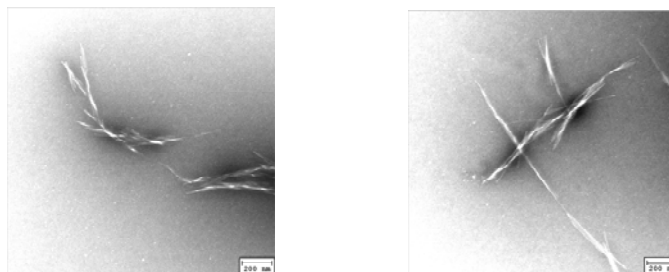


Abb.C3-25 Aggregationskurven von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, und von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen und mit Inhibitor **80**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten die erhaltenen Messdaten. Im Vergleich zu der Zn^{2+} -induzierten Kontrolle (vgl. Abb.C3-24, S.75) wies die Probe kein Netzwerk zusammengelagerter Fibrillen auf und zeigte nur sehr wenige längere, filigrane Fibrillen ohne ausgeprägtes Aggregationsmuster (Abb.C3-26).



75 μM $\text{A}\beta_{40}$ + Zn^{2+} -Ionen + **80** (Verhältnis 3:4) (in DMSO)

Abb.C3-26 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\text{A}\beta_{40}$ mit Zusatz von Zn^{2+} -Ionen (20 μM) und Inhibitor **80**

Das acylierte Clioquinol-Derivat **81** ohne Nitratfunktion zeigte unter keiner der untersuchten Assay-Bedingungen einen inhibitorischen Effekt auf die $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation. Weder durch einen Zusatz von Zink-Ionen noch durch einen Zusatz von Kupfer-Ionen konnten eine Hemmung oder ein Hinauszögern der Aggregation beobachtet werden. Die Aggregationskurven deckten sich mit dem Kurvenverlauf des jeweiligen, mit demselben Ion induzierten $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregations-Kontrollversuches. Zwar zeigte sich hier ebenfalls, wie in Abb.C3-20 (S.73) dargestellt, eine Kupfer-induzierte Verminderung der Aggregation, jedoch ließ sich diese Hemmung nicht durch den Zusatz von **81** verstärken oder aber ein Hinauszögern der Aggregation erzeugen (zusammengefasst in Abb.C3-28, S.78 und Abb.C3-29, S.79).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass neben dem bekannten Wirkmechanismus, dem System die aggregationsfördernden Ionen zu entziehen, noch ein weiterer Wirkmechanismus zu existieren scheint. Möglicherweise könnte ein entstehender Clioquinol-Zink- bzw. Clioquinol-Derivat-Zink-Komplex (Abb.C3-22, S.74 und Abb.C3-25) selbst einen aggregationshemmenden Effekt ausüben. Strukturell unterscheiden sich die beiden Clioquinol-Derivate **80** und **81** nur hinsichtlich des organischen Nitrat-Restes. Bereits bei der Testung der unterschiedlichen Statin-Derivate zeigte das Nitrat-Statin-Hybrid **41** die stärkste Hemmung der $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation (Abb.C3-13, S.68). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass organische Nitrat-Reste zu der inhibitorischen Wirkung beitragen.

Auch bei **80** führte der Zusatz von Kupfer-Ionen zu dem System zu einem Verlust des inhibitorischen Effektes. Neben der Kupfer-induzierten Hemmung der $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation konnten für **80** jedoch weder eine inhibitorische Aktivität noch ein Einfluss auf den Aggregationsstart beobachtet werden (zusammengefasst in Abb.C3-28 und Abb.C3-29).

Zusammenfassend lässt sich nach den erhaltenen Ergebnissen für Clioquinol (**79**) (Abb.C3-21 und Abb.C3-22, S.74) und das Clioquinol-Derivat **80** (Abb.C3-25) darüber spekulieren, ob ein

möglicherweise entstehender Zink-Komplex einen stärkeren Aggregationshemmer als **79** selbst darstellt (Abb.C3-27).

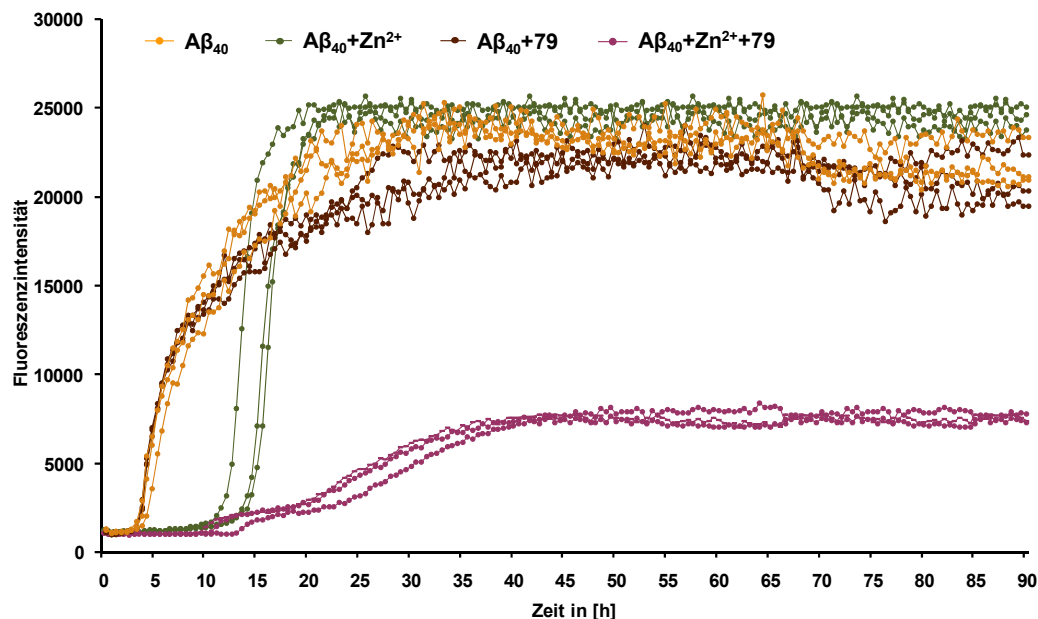


Abb.C-27 Aggregationskurven von Aβ₄₀ ohne Zusatz von Metallionen und ohne Inhibitor, dargestellt in einer gelben Kurvenschar, und Aβ₄₀ mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen ohne Inhibitor, dargestellt in einer grünen Kurvenschar, sowie Aβ₄₀ ohne Zusatz von Metallionen mit Inhibitor **79**, dargestellt in einer braunen Kurvenschar, und Aβ₄₀ mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen und Inhibitor **79**, dargestellt in einer lilafarbenen Kurvenschar

Verbindungs-
nummer:

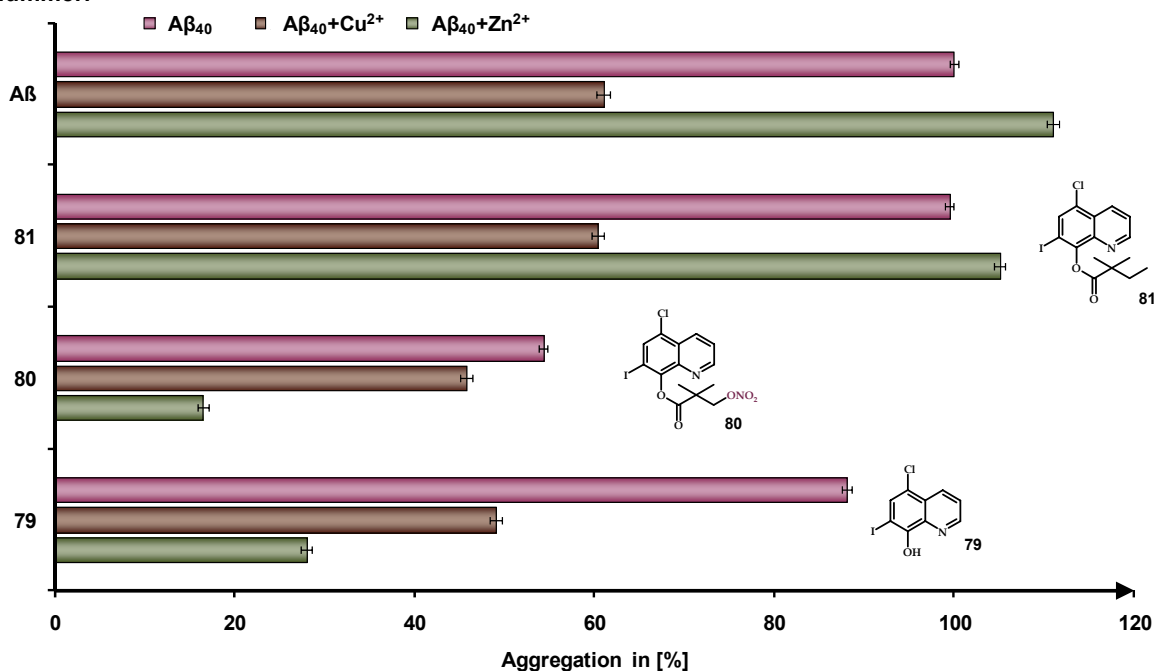


Abb.C3-28 Zusammenfassende Darstellung der prozentual berechneten Aggregationswerte für Clioquinol (**79**), dessen nitroacyliertes Derivat **80** sowie dessen acyliertes Derivat **81**. Zur besseren Übersicht der Ergebnisse sind Messergebnisse ohne Zusatz von Metallionen mit einem lilafarbenen Balken, Messergebnisse mit Zusatz von Cu²⁺-Ionen mit einem braunen Balken sowie Messergebnisse mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen mit einem grünen Balken dargestellt. Die Berechnung aller Werte erfolgte in Bezug zu der Aβ₄₀-Kontrolle ohne Zusatz von Metallionen. Kürzere Balken stehen hierbei für eine stärkere Hemmung der Aβ₄₀-Aggregation.

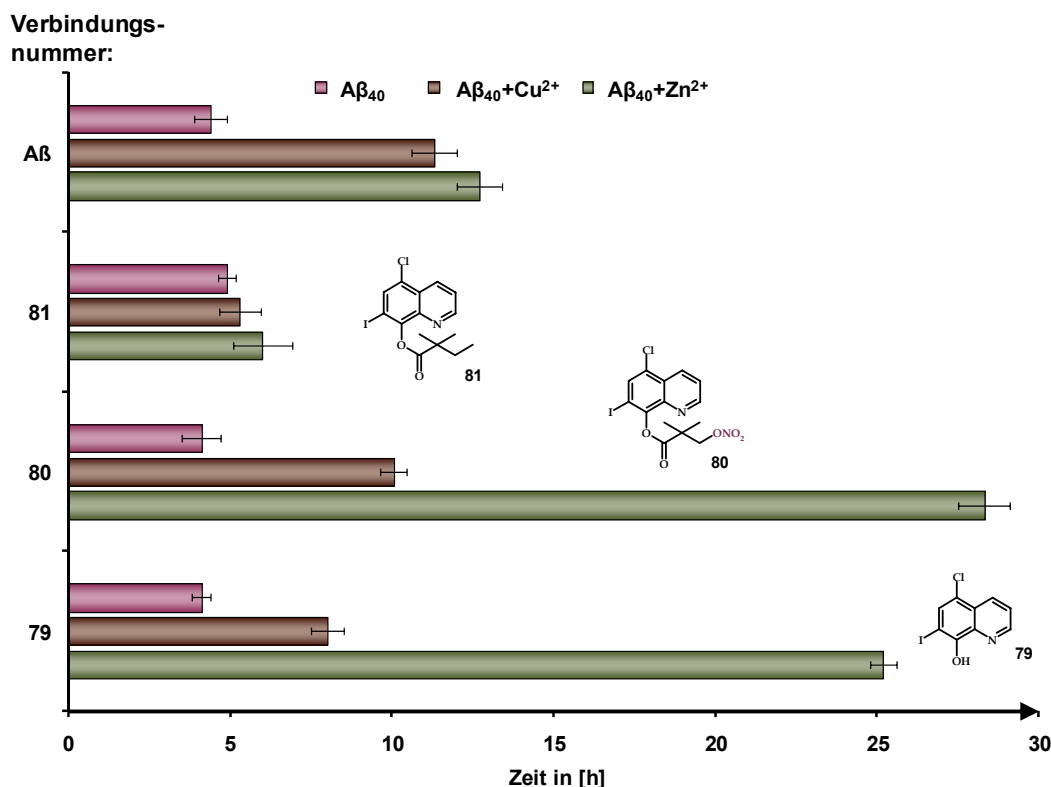


Abb.C3-29 Zusammenfassende Darstellung der berechneten Werte für die lag time für Clioquinol (**79**), dessen nitratoacyliertes Derivat **80** sowie dessen acyliertes Derivat **81**. Zur besseren Übersicht der Ergebnisse sind Messergebnisse ohne Zusatz von Metallionen mit einem lilafarbenen Balken, Messergebnisse mit Zusatz von Cu²⁺-Ionen mit einem braunen Balken sowie Messergebnisse mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen mit einem grünen Balken dargestellt. Längere Balken stehen hierbei für eine stärkere Verzögerung der Aβ₄₀-Aggregation.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre eine andersartig verlaufende, Zink-induzierte Aggregation im Vergleich zu der spontanen, selbst-induzierten. Möglicherweise resultiert die Zink-induzierte Aggregation auch in einem anderen Polymer bzw. in einer anderen Fibrillenmorphologie. Dies würde bedeuten, dass sowohl **79** als auch **80** die durch Zink ausgelöste Aggregation sehr effektiv inhibieren, wohingegen sie einen eher schwachen inhibitorischen Einfluss auf die selbst-induzierte Aggregation ausüben.

C.3.2.8 Untersuchung des wirkstärksten Nitrat-Lovastatin-Hybrides **41** auf die durch Zn²⁺-Ionen geförderte Aggregation

Um weitere Kenntnisse über die durch Zink-Ionen geförderte Aggregation zu erlangen, wurde **41** ebenfalls nach einem Zusatz des Metallions vermessen. Tatsächlich konnte die ausgeprägte inhibitorische Wirkung des Aggregationshemmers **41** auf die „Zink-freie“ Spontanaggregation hierbei nicht aufrecht erhalten werden. So führte der Zusatz von Zink-Ionen zu einer stark abgeschwächten Wirkaktivität von **41** mit einer Minderung der Aβ-Aggregation auf nur 78% im Gegensatz zu der Inhibition auf 35% ohne Zink-Zusatz (Abb.C3-30).

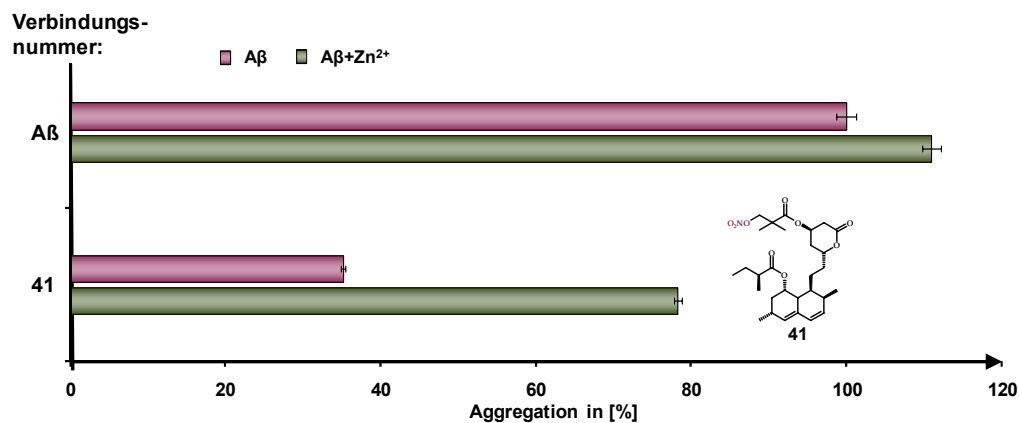


Abb.C3-30 Zusammenfassende Darstellung der prozentual berechneten A β ₄₀-Aggregationswerte für Nitrat-Lovastatin-Derivat **41**. Zur besseren Übersicht der Ergebnisse, sind die Messergebnisse ohne Zusatz von Metallionen mit einem lilafarbenen Balken, und die Messergebnisse mit Zusatz von Zn²⁺-Ionen mit einem grünen Balken dargestellt. Die Berechnung aller Werte erfolgte in Bezug zu der A β ₄₀-Kontrolle ohne Zusatz von Metallionen. Kürzere Balken stehen hierbei für eine stärkere Hemmung der A β ₄₀-Aggregation.

D Zusammenfassung

Da ein erhöhter Cholesterolspiegel als Risikofaktor bei der Alzheimer-Erkrankung gilt, wurde den Statinen in den letzten Jahren mehrfach ein günstiger Einfluß auf die Krankheit zugeschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob Statine neben ihrem lipidsenkenden Charakter auch einen inhibierenden Effekt hinsichtlich der β -Amyloid-Aggregation zeigen. Darüber hinaus sollten sie strukturell so modifiziert werden, dass ein eventueller inhibitorischer Effekt noch verstärkt wird. Da in der Literatur NO-freisetzende Verbindungen durch ihre durchblutungs-fördernde und entzündungshemmende Wirkung als mögliche Demenz-Therapeutika diskutiert werden, lag die Überlegung nahe, Statinstrukturen auch mit NO-gebenden Strukturen, wie z. B. einem organischen Nitrat, molekular zu vereinigen (Nitrat-Statin-Hybride).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, ausgehend von Simvastatin (**1**) und Lovastatin (**3**), 16 O-acylierte Statin-Derivate synthetisiert, wobei vier der erhaltenen Derivate Nitrat-Statin-Hybride darstellen. Die Syntheseprodukte und die während der Synthese erhaltenen Vorstufen wurden sowohl auf HMG-CoA-inhibierende und vasodilatorische als auch auf β -Amyloid-aggregationshemmende Wirkungen untersucht.

Der Gliederung in Kap. A.10 folgend, sollen die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst werden.

D.1 Synthese des Nitrat-Simvastatin-Hybrides **2** und weiterer Nitrat-Statin-Hybride

Die Darstellung des Nitrat-Simvastatin-Hybrides **2**, in dem auf einen *spacer* zwischen Statin und Nitrat verzichtet wurde, gelang durch intermediäre Silylierung der reaktiveren lactonischen Hydroxylgruppe nach dem unter Abb.D-1 dargestellten Syntheschema. Das aus Lovastatin zugängliche Derivat **2** ist somit das Simvastatin-ähnlichste Derivat der gesamten Serie.

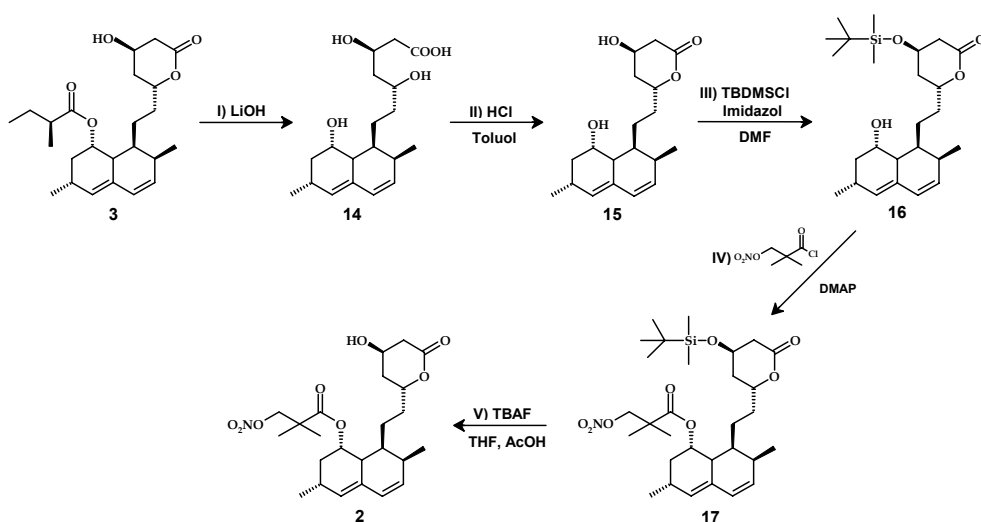


Abb.D-1 Synthese des Nitrat-Simvastatin-Derivates **2**

Weitere, in Abb.D-2 dargestellte, Nitrat-tragende Statin-Derivate wurden durch Umsetzung mit 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoylchlorid (**33**) und katalytischen Mengen an DMAP in einem Gemisch aus Chloroform und Pyridin (**40** und **41**) bzw. in Pyridin (**74**) synthetisiert.

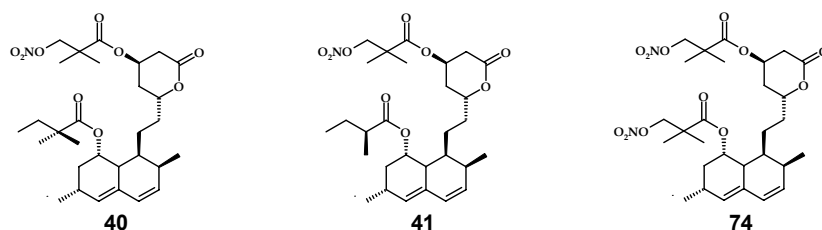


Abb.D-2 Darstellung der synthetisierten Nitrat-Statin-Derivate **40**, **41** und **74**

Die analoge Synthese der Nitrat-Statin-Hybridsubstanzen **42** und **43** durch Acylierung mit 2-Nitrooxypropanoylchlorid (**34**) gelang nicht, bei wiederholten Versuchen konnten lediglich die α,β -ungesättigten Eliminierungsprodukte **44** und **45** isoliert werden (Strukturen siehe Abb.D-3 und Abb.D-8).

D.2 Synthese verschiedener, an der lactonischen Hydroxylgruppe modifizierter Simvastatin- und Lovastatin-Derivate

Die hierzu durchgeführten strukturellen Modifikationen sind nachfolgend schematisch wiedergegeben.

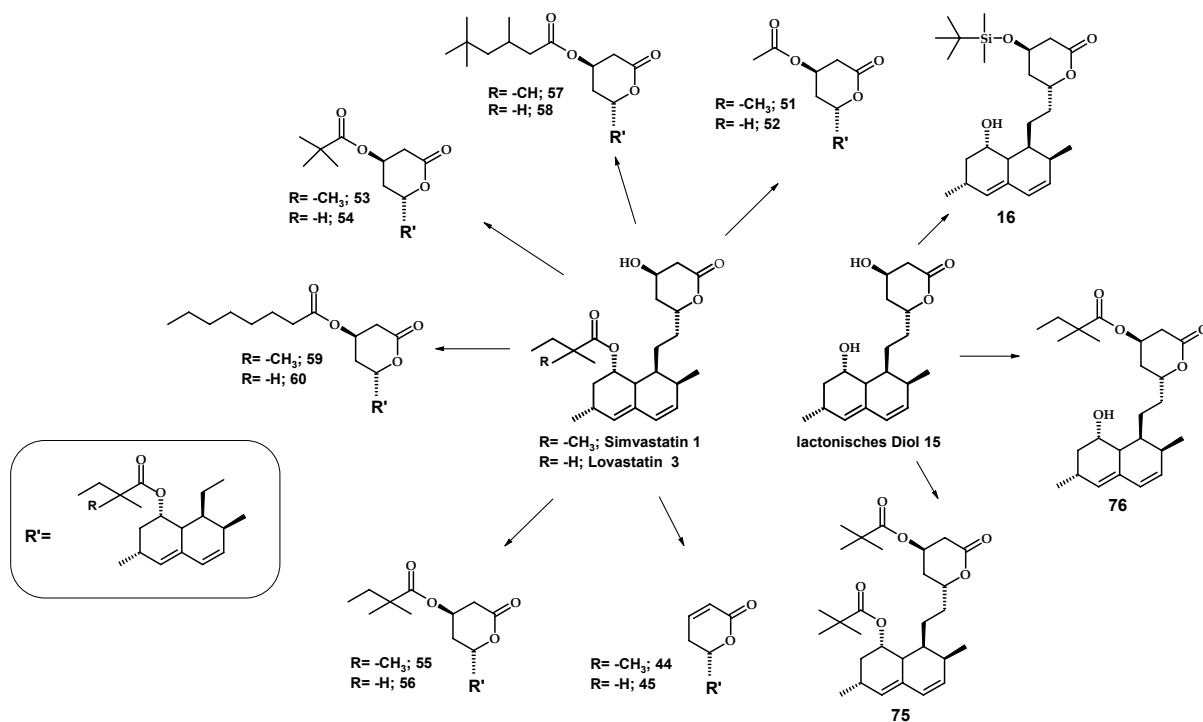


Abb.D-3 Synthetisierte und pharmakologisch untersuchte Statin-Derivate

Während der synthetischen Arbeiten stellte sich heraus, dass eine Acylierung der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes, wie schon bei der Umsetzung mit 2-Nitrooxypropanoylchlorid

festgestellt, nicht in jedem Falle gelingt, da es in einer Eliminierungsreaktion zu dem ungesättigten Lacton kommen kann (s. Abb.D-3, Derivat **44** bzw. **45**). Diese Eliminierung konnte generell durch Kühlung auf 0°C weitestgehend unterdrückt werden. Eliminierungsreaktionen traten nur während der Reaktion und der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes auf, die isolierten Derivate waren jedoch stabil. Die Tendenz zur Eliminierung scheint mit der Reaktivität des eingesetzten Säurechlorides zu korrelieren. Erfolglos verliefen folglich die Acylierungen mit Tosylchloriden und dem hochreaktiven gasförmigen Trifluoressigsäurechlorid.

D.3 Untersuchung der vasodilatorischen Eigenschaften der Hybrid-Verbindungen

Alle synthetisierten Nitrat-Statin-Hybride wurden hinsichtlich ihrer vasodilatorischen Eigenschaften untersucht, wobei jedes einen Effekt zeigte. Da die getesteten Hybride das gleiche „Trägermolekül“ aufweisen, korrelierte die vasodilatorische Potenz am isolierten Gefäß mit der Anzahl der vorhandenen Nitrat-Reste im Molekül. Das gemessene Dinitrat-Statin-Hybrid (**74**) zeigte mit einem EC_{50} von $7,0 \cdot 10^{-7}$ M die höchste vasodilatorische Wirksamkeit, vergleichbar mit dem Dinitrat ISDN ($EC_{50} = 4,0 \cdot 10^{-7}$ M). Sowohl bei den gemessenen Mononitrat-Statin-Hybriden (**2** und **41**) als auch bei der 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (**21**) lagen die vasodilatorischen Effekte im Bereich von 5-ISMN ($EC_{50} = 3,2 \cdot 10^{-5}$ M). Die Ergebnisse zeigen, dass die Einführung des großen organischen Statin-Grundgerüsts die vasodilatorische Wirkstärke dieser Nitate nicht mindert.

D.4 Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Statin-Derivaten auf die HMG-CoA-Reduktase

Eine Auswahl unterschiedlicher Statin-Derivate wurde hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkaktivität auf die HMG-CoA-Reduktase untersucht.

Hierbei führte die Einführung eines organischen Nitrat-Restes an das Simvastatin-Grundgerüst ohne *spacer* (**2**) im Vergleich zu der Leitstruktur, fast erwartungsgemäß aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, lediglich zu einer geringen Abschwächung der Wirkpotenz. Modifikationen der offensichtlich essentiellen OH-Gruppe des Lacton-Ringes, sei es durch Acylierung (**60**, **41** bzw. **74**) oder Eliminierung (**45**), führten zu einem stärkeren Verlust an Statin-typischer Wirkaktivität. Darüber hinaus scheint die Esterseitenkette des Hexahydronaphthalen-Grundgerüsts für die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase von Bedeutung zu sein, da die Abspaltung des Esters (**15**) zu einem drastischen Verlust des inhibitorischen Effektes führte. Atorvastatin (**77**) und dessen, sich bereits in der aktiven Form befindendes Lacton-Derivat (**78**) zeigten ähnliche inhibitorische Effekte (Abb.D-4, Strukturen sind in Abb.D-5 bzw. Abb.D-8 dargestellt).

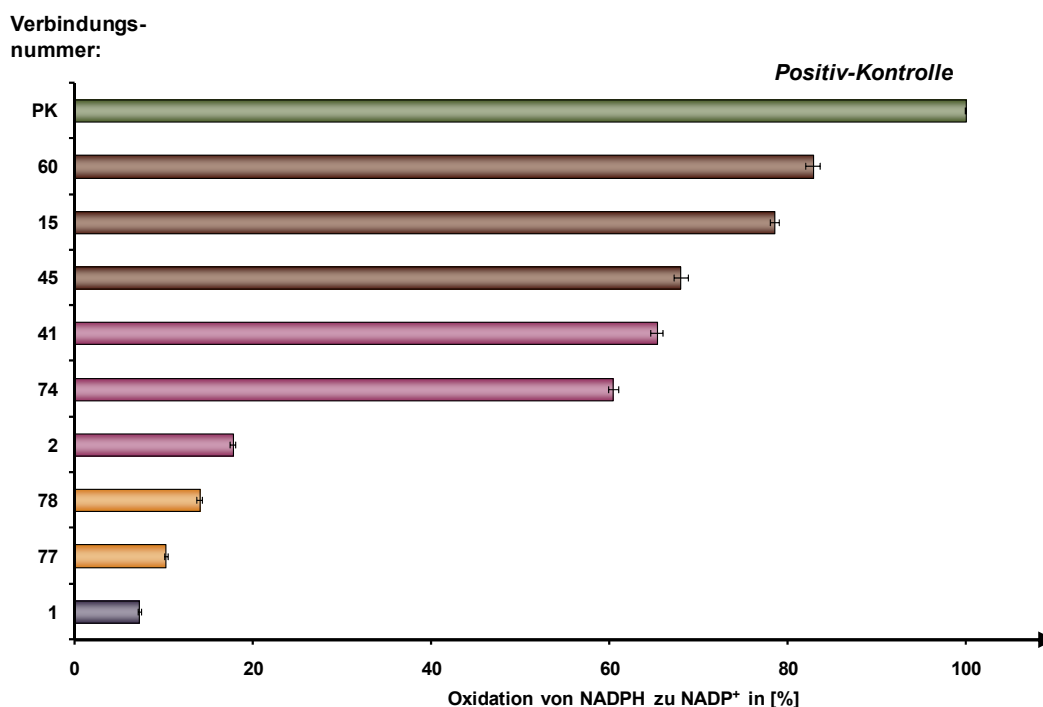


Abb.D-4 Übersicht aller, an der HMG-CoA-Reduktase getesteten Statine (**1** und **77**) und Statin-Derivate (**2**, **41**, **45**, **60**, **74**, **78**) sowie des lactonischen Diols **15**. Die inhibitorische Aktivität nimmt nach unten hin zu. Zur vereinfachten Darstellung sind alle Nitrat-tragenden Derivate mit einem lilafarbenen und Atorvastatin (**77**) und dessen relactonisiertes Diol (**78**) mit einem gelben Balken dargestellt. Weitere Statin-Derivate sind mit einem braunen Balken dargestellt. Darstellung der Strukturen unter Abb.D-5 und Abb.D-8.

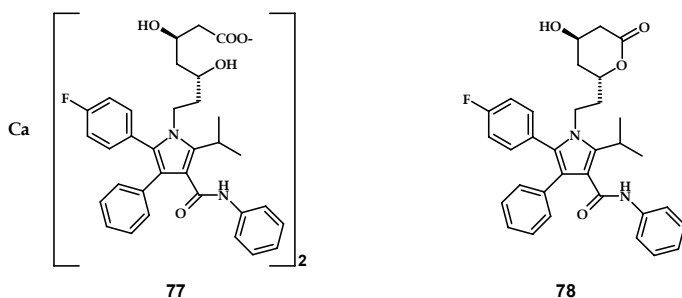


Abb.D-5 Atorvastatin-Calcium (**77**) und Atorvastatin-Lacton (**78**)

D.5 Etablierung eines Assays zur Untersuchung der direkten A β -Aggregation

Ein Amyloid-Aggregations-Assay wurde erfolgreich etabliert. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes und spezifischen Fibrillenmarkers Thioflavin T ermöglichte eine Auswertung der durch Statin-Derivate gehemmten *in vitro* Aggregation von A β ₄₀. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte das durch Fluoreszenz-Messungen charakterisierte Aggregationsverhalten bestätigt werden.

D.5.1 Untersuchungen von Statinen und synthetisierten Statin-Derivaten

Keines der kommerziell erhältlichen, getesteten Statine (Simvastatin, Lovastatin, Pravastatin und Atorvastatin) zeigte eine signifikante inhibitorische Wirkung. Die durch Modifikation der Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes, sei es durch Acylierung oder Eliminierung, erhaltenen

Simvastatin- und Lovastatin-Derivate inhibierten dagegen die $A\beta_{40}$ -Aggregation in unterschiedlichem Maße, häufig aber deutlich (zusammengefasst in Abb.D-7).

Beide Eliminierungsprodukte (**44** und **45**) zeigten im Vergleich zu den originären Statinen einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die direkte $A\beta_{40}$ -Aggregation mit einer Minderung auf 45% durch das Anhydro-Simvastatin **44** und einer etwas schwächeren Minderung der Aggregation auf 65% durch das Anhydro-Lovastatin **45**.

Die Einführung eines Nitroacyl-Restes an die Hydroxylgruppe des Lacton-Ringes führte bei beiden Statinen zu einer ausgeprägten inhibitorischen Wirkaktivität. Die höchste inhibitorische Aktivität zeigte das Nitrat-tragende Lovastatin-Derivat **41** mit einer bemerkenswerten Minderung der Aggregation auf 35% (Abb.D-6). Das analoge nitroacylierte Simvastatin-Derivat **40** zeigte ebenfalls einen deutlichen inhibitorischen Effekt mit einer Senkung der Aggregation auf 46%.

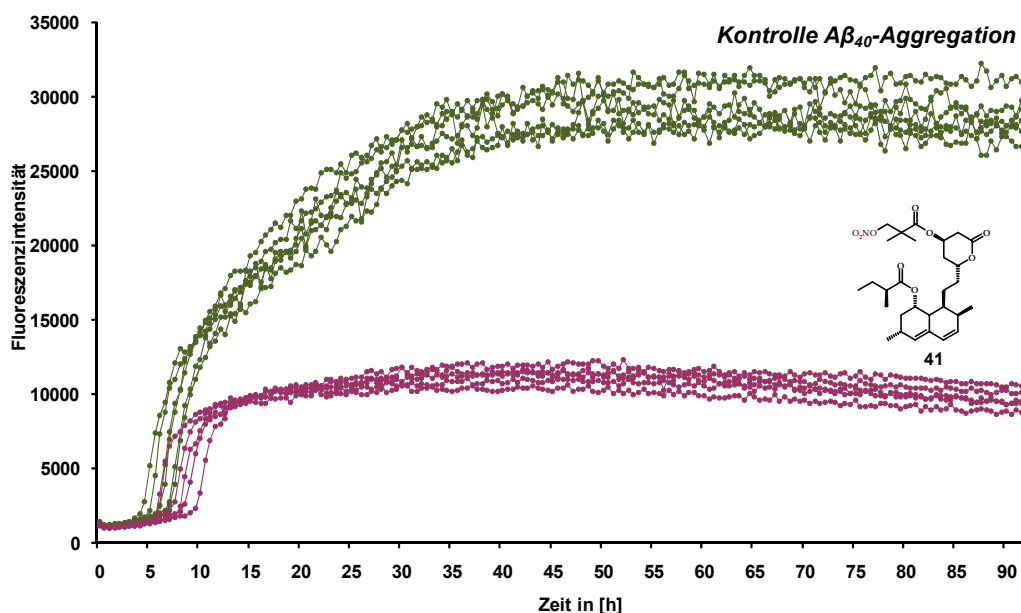


Abb.D-6 Das Nitrat-Statin-Hybrid **41** senkt die spontane Aggregation von $A\beta_{40}$ zu Amyloidfibrillen von 100% auf 35%.

Weder das lactonische Diol (**15**) (Abb.D-7 und Abb.D-8) noch die Modellsubstanz 3-Hydroxy- γ -butyrolacton (**82**) (nicht dargestellt, vgl. Kap.B.11) zeigten eine signifikante Inhibition der $A\beta_{40}$ -Aggregation, was auf die Notwendigkeit des Hexahydronaphthalen-Grundgerüsts und der Statin-Seitenkette für die Wirkaktivität schließen lässt.

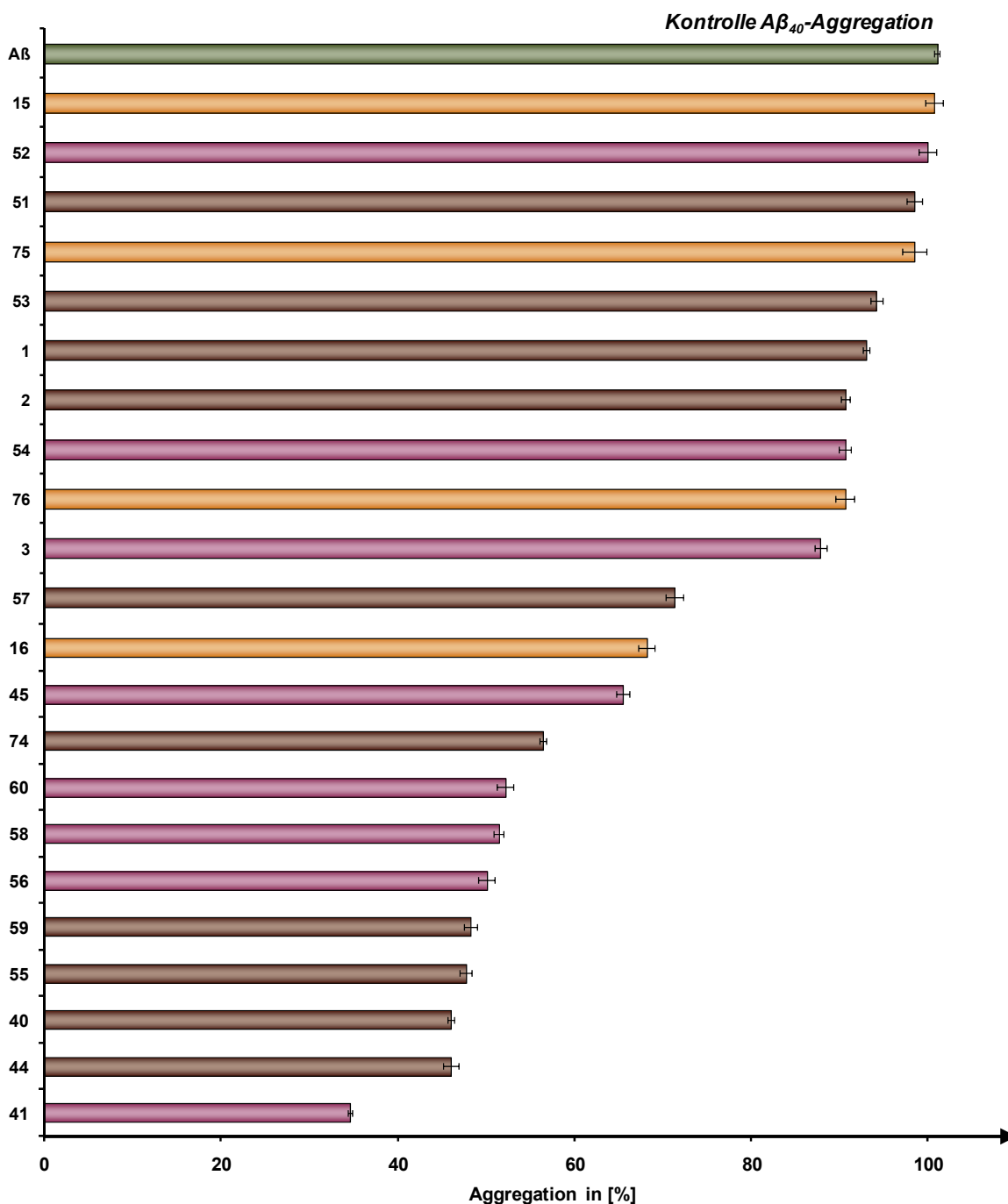


Abb.D-7 Hemmung der $A\beta_{40}$ -Aggregation durch alle getesteten Statin-Derivate. Alle Simvastatin-Derivate sind mit einem braunen, alle Lovastatin-Derivate mit einem lilafarbenen Balken, weitere Statin-Derivate mit einem gelben Balken dargestellt. Die inhibitorische Potenz nimmt von oben nach unten zu.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass sowohl die Länge und die Verzweigung der Acylkette als auch der organische Nitrat-Rest die inhibitorische Aktivität der Statin-Derivate auf die direkte $A\beta_{40}$ -Aggregation bestimmen. Jedoch scheint der inhibitorische Effekt nicht „additiv“ an einzelne Strukturelemente, sondern vielmehr an ein Zusammenspiel dieser, und somit an die Gesamtstruktur der Verbindung, gebunden zu sein.

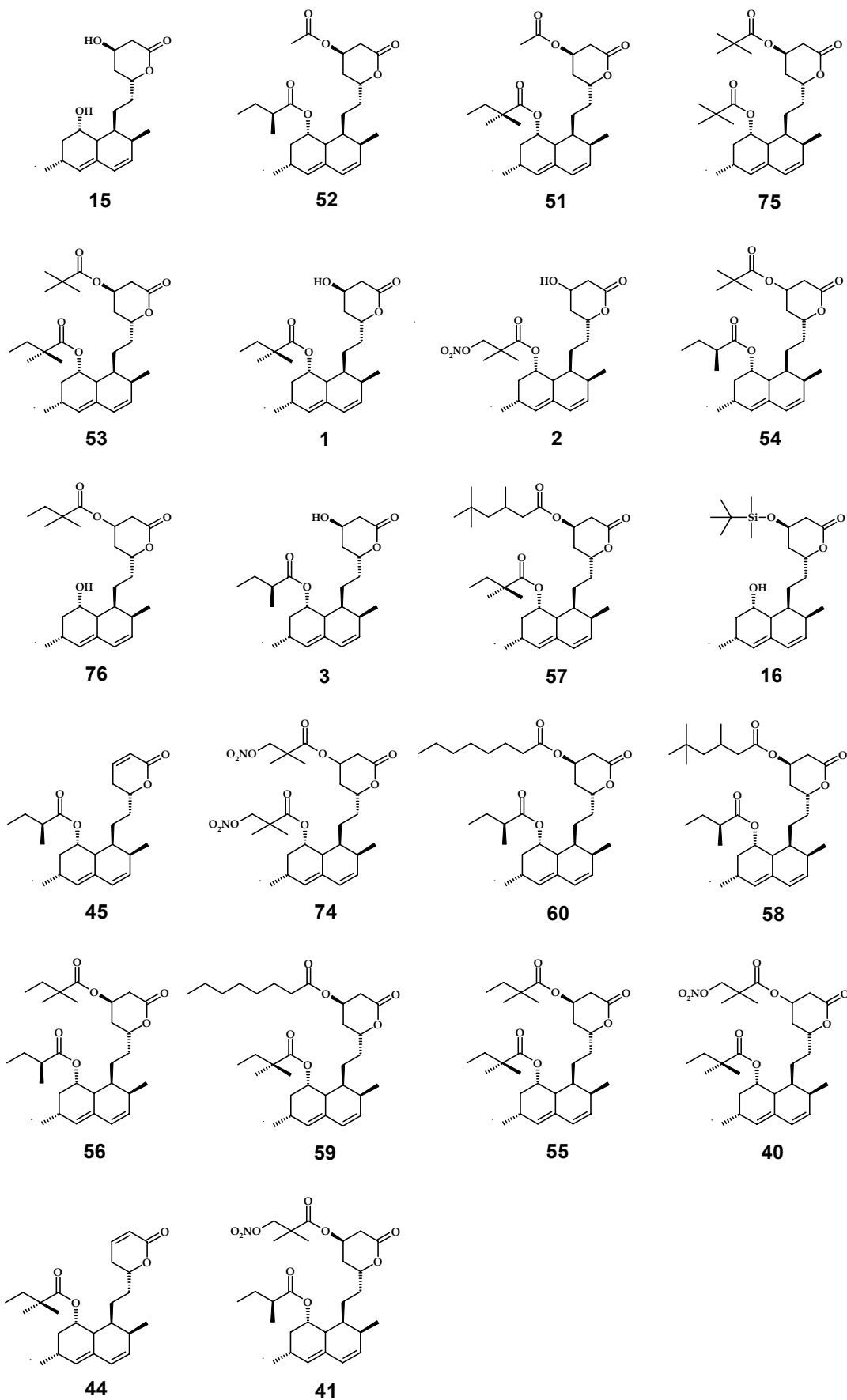


Abb.D-8 Strukturen aller getesteten Simvastatin- und Lovastatin-Derivate. Die inhibitorische Wirkaktivität nimmt von 15 nach 41 hin zu.

D.6 Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Rifampicin und Clioquinol

Rifampicin [Tomiya, 1994/1996; Loeb, 2004] und Clioquinol [Cherny, 2001; Regland, 2001] sind in der Literatur als β -Amyloid-Aggregationshemmer beschrieben. Hier zeigte Rifampicin nun sowohl in dem THT-Aggregations-Assay einen starken inhibitorischen Effekt von 80% als auch eine deutliche Minderung der Fibrillen-Bildung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dieser Effekt war jedoch nicht für Clioquinol (**79**) feststellbar. Bemerkenswerterweise zeigte es erst nach Zugabe von Zink-Ionen (ZnCl_2) eine inhibitorische Wirkung. Erstaunlicherweise führte das nitroacylierte Clioquinol **80**, welches keine, laut Literatur aber essentielle, chelatbildende phenolische Funktion aufweist, bereits ohne Zusatz von Metallionen zu einer moderaten Minderung der Aggregation auf 54%. Durch den Zusatz von Zink-Ionen ließ sich diese noch auf bemerkenswerte 16% verstärken. Demnach scheint ein möglicherweise entstehender Clioquinol-Zink-Komplex einen potenteren Aggregationsinhibitor als **79** und **80** selbst darzustellen. Das acylierte Clioquinol-Derivat (**81**) übte im Gegensatz zum nitroacylierten Derivat unter keiner der untersuchten Assay-Bedingungen einen Effekt auf die direkte $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation aus (Abb.D-9). Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten grundsätzlich alle erhaltenen Messergebnisse.

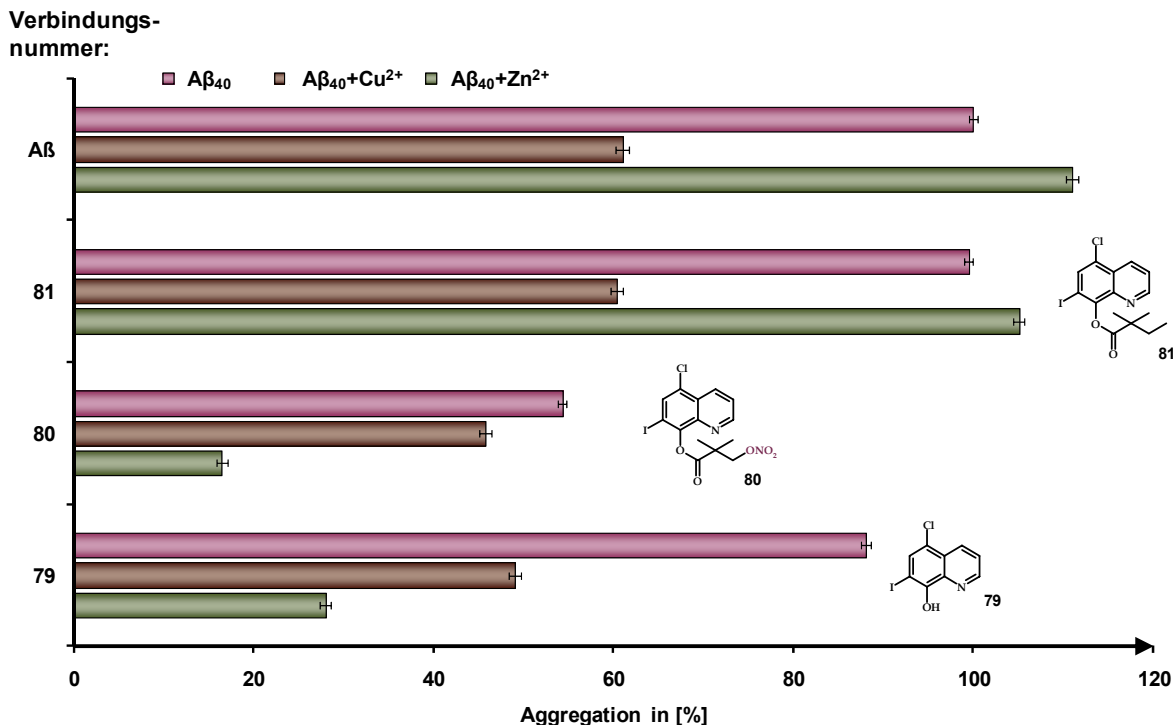


Abb.D-9 Darstellung der inhibitorischen Wirkaktivität von Clioquinol (**79**) und dessen acyliertem bzw. nitrooxy-acyliertem Derivat auf die reine $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation sowie die durch Zn^{2+} - bzw. Cu^{2+} -Ionen induzierte Aggregation. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Positivkontrolle ohne Zusatz von Metallionen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass durch Modifikation der Hydroxylgruppe des Statin-Lactones potentielle Inhibitoren der $\text{A}\beta_{40}$ -Aggregation erhalten

werden können. Weitere Untersuchungen und die strukturelle Weiterentwicklung des wirkstärksten Nitrat-Lovastatin-Derivates **41** könnten eine interessante Option für mögliche Alzheimer-Therapeutika darstellen.

Darüber hinaus deuten erste Untersuchungen an Clioquinol und dessen nitratoacyliertem Derivat **80** auf einen stark ausgeprägten aggregationshemmenden Effekt in Anwesenheit von Zink-Ionen hin. Auch hier bieten sich Forschungsansätze zur Alzheimer-Therapie, die gegebenenfalls über die bisher bekannten mechanistischen Vorstellungen hinausgehen.

E Abstract

Statins are classically used in the treatment and prevention of hypercholesterolaemia due to their ability to inhibit the biosynthesis of cholesterol by blocking HMG-CoA-reductase, which is the rate limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. Meanwhile, some studies have suggested the possible use of statins as potential therapeutics in the treatment of Alzheimer's disease. Different pathways apart from their inhibitory activity on HMG-CoA-reductase have been explored. It has been shown that statins influence the release of β -amyloid, which aggregates to senile plaques, a pathological hallmark of AD. Although the mechanism has still not been fully discerned, it has been attributed to decreased cholesterol levels as well as decreased isoprenoid biosynthesis, which directly influences APP processing. NO-releasing substances have also been advocated to be of potential use in antidementive therapy due to their anti-inflammatory effect and their ability to improve the blood circulation.

Notion behind this work was to determine the potential inhibitory effect of statins on β -amyloid-aggregation, as another possible pathway of their mode of action. Another goal was to prepare nitrate-statin-hybrid molecules in order to assess the extent to which the combination of these two promising pharmacophores would lead to a synergistic effect.

Furthermore, some selected compounds were tested for their cholesterol-lowering and vasodilatory potencies to determine the influence of the structural modification on the biological activity.

A novel nitratoacylated-simvastatin derivative was obtained by cleaving the ester-side-chain, followed by selective protection of the lactonic alcohol and introduction of the nitrated-side-chain by acylation. Introduction of an organic nitrate to the simvastatin-scaffold resulted in only a slight decrease in the HMG-CoA-reductase inhibitory potency. In contrast, modification of the lactonic OH-group, which is crucial for inhibitory activity, either through acylation or elimination resulted in almost a complete loss of inhibitory potency.

As expected all tested nitratoacylated compounds showed a vasodilatory effect. Since all tested derivatives encompass the same carrier molecule, the relaxation potency of the organic nitrates correlated with the number of nitrate groups in the molecule. In conclusion, the introduction of the bulky organic statin-scaffold did not result in a decrease of the vasodilatory potencies.

A cell-free $A\beta_{40}$ -aggregation assay was successfully established, to investigate the possible direct effect of statin derivatives on β -amyloid-aggregation. For this purpose, the inhibitory activity of statins on $A\beta_{40}$ -aggregation was assessed as a function of the fluorescence of thioflavin T. The inhibitory activity, which was observed by the decrease of the measured fluorescence intensities, was further confirmed by electron microscopy.

None of the commercially available statins showed any direct inhibitory potency on $A\beta_{40}$ -aggregation. However we discovered that modifying the statin structures at their free

lactonic-hydroxyl-group either by acylation or elimination, yields compounds with direct yet varying inhibitory potency on A β ₄₀-aggregation. Hence, prevention of plaque formation might be possible.

Results indicate that the inhibitory potency depends on the length and nature of the side-chain. An organic nitrate seems to enhance the inhibition of A β ₄₀-aggregation. Nevertheless, it is likely

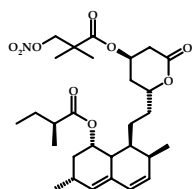


Fig.E-1 nitratoacylated
Lovastatin-derivative **41**

that a combination and interaction of several structural elements, rather than a single structural feature, lead to the inhibitory potency. The highest potency was observed for the nitratoacylated lovastatin derivative **41** (Fig.E-1), which reduced A β ₄₀-aggregation down to 35% compared with the untreated control.

Both aggregation inhibitors rifampicin and clioquinol, which are reported in the literature, were also tested in the established A β ₄₀-assay. In the THT-assay as well as in electron microscopic investigations rifampicin, but not clioquinol, showed a distinctive inhibitory effect down to 20% compared with the untreated control.

Nevertheless, addition of Zn²⁺-ions to both clioquinol and its nitratoacylated derivative led to a significant increase in their inhibitory potency on A β ₄₀-aggregation. Besides the well known ability of clioquinol to withdraw zinc from the system, this result surprisingly indicates that a formed

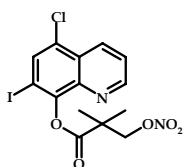


Fig.E-2 nitratoacylated
clioquinol-derivative **80**

clioquinol-zinc-complex might be a more potent aggregation inhibitor than clioquinol itself. Although the nitratoacylated clioquinol derivative **80** does not feature the characteristic chelating free hydroxyl-group, it shows the highest potency by reducing A β ₄₀-aggregation down to 10% compared with untreated control in the presence of zinc.

F Experimenteller Teil

F.1 Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten

Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien, Kieselgel 60 F254 (Merck (Darmstadt, Deutschland))

Elementaranalyse

Vario EL III (CHNOS Elementaranalysator) (Elementar Analysensysteme GmbH (Hanau, Deutschland)). Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie an der FSU Jena durchgeführt.

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (Merck (Darmstadt, Deutschland))

Schmelzpunktbestimmung

Melting Point Apparatus (Gallenkamp (Loughborough, United Kingdom)), nicht korrigiert

Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet Avatar 370 DTGS FTIR-Spectrometer (Therma Electron Corporation (Waltham, USA))

Kernresonanzspektroskopie (^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren)

Avance 200, Avance 250, Avance 400 (Bruker Biopsin (Karlsruhe, Deutschland)). Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie an der FSU Jena durchgeführt.

Massenspektren (hochauflösende Masse)

TSQ Quantum AM Spectrometer (Therma Electron Corporation (Waltham, USA)). Die Messungen wurden am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt.

F.2 Allgemeine Angaben zu Chemikalien

Alle Säurechloride, wenn nicht weiterführend diskutiert, wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Lovastatin TCI (Eschborn, Deutschland)

Clioquinol Fluka (Deisenhofen, Deutschland)

3-Hydroxy- γ -butyrolacton molekula Deutschland Ltd.(Taufkirchen, Deutschland)

TBDMSCI Merck (Darmstadt, Deutschland)

F.3 Synthesen

(4*R*,6*R*)-4-Hydroxy-6-{2-[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl}tetrahydro-2*H*-pyran-2-on (15)

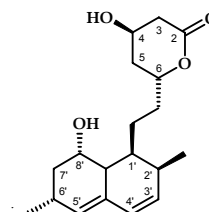
Entsprechend einer Vorschrift von Willard und Smith werden 7.00 g (17.30 mmol) Lovastatin (**1**) zusammen mit 4.15 g (173.30 mmol) LiOH in 500 ml H₂O unter Rückfluss 96 h lang erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 0°C, werden 20 ml konz. HCl zugegeben, wobei das Produkt teilweise ausfällt. Die Suspension wird mit Diethylether (3 × 150 ml) extrahiert und die organische Phase mit H₂O (3 × 150 ml) und ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. vac. entfernt [Willard und Smith, 1981]. Das verbleibende gelbliche Öl wird in 150 ml Toluol gelöst und 3 h im Wasserabscheider zur Entfernung von azeotropem H₂O unter Rückfluss erhitzt. Toluol wird abdestilliert und der verbleibende Rückstand aus 30 ml n-Hexan umkristallisiert. Das Produkt wird über Nacht in der Kälte ausgefällt, abfiltriert und i. vac. getrocknet.

MG: C₁₉H₂₈O₄ (320,32 g/mol)

Ausbeute: 4,42 g (75%); weißer Feststoff

Smp.: 129-134°C

Lit. [Lee, 2004]: 128°C



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91-0.88	d (J = 6.9 Hz)	3	C2'-CH ₃
1.20-1.17	d (J = 7.6 Hz)	3	C6'-CH ₃
2.88-1.46	m	14	H3,H5, C5-CH ₂ , C1'-CH ₂ H1', H2', H6',H7',H8'a
4.25-4.23	m	1	H8'
4.39-4.33	m	1	H4
4.75-4.67	m	1	H6
5.39-5.23	m	1	H5'
5.82-5.76	m	1	H3'
5.99-5.96	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
13.97	C6'-CH ₃
23.76	C2'-CH ₃
24.07	C1'-CH ₂
27.41	C6'
30.76	C2'
32.75	C7'
35.80	C6-CH ₂
36.28	C5
36.30	C1'
38.60	C3

δ [ppm]	Zuordnung
38.71	C8'a
62.66	C4
65.29	C8'
76.20	C6
128.48	C3'
130.10	C5'
131.31	quart., C4'a
133.62	C4'
170.71	quart., C2

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	70,92	8,80	-
berechnet für C ₁₉ H ₂₈ O ₄	71,22	8,81	-

(4*R*,6*R*)-4-[(*Tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy]-6-{2-[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-8-hydroxy-2,6-di-methyl-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl}tetrahydro-2*H*-pyran-2-on (16)**

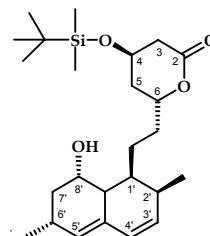
Nach einer modifizierten Vorschrift von Willard und Smith werden 4,30 g (13,40 mmol) **15** unter Stickstoff in 100 ml DCM gelöst. Zu der Lösung werden 4,60 g (67,79 mmol) verrieenes Imidazol und 6,20 g (34,20 mmol) TBDMSCl gegeben und 9 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit H₂O (3 × 100 ml), 2%-ige HCl-Lösung (100 ml), NaHCO₃-Lösung (50 ml) und NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. vac. eingedampft. Zu dem verbleibenden Rückstand werden 30 ml n-Hexan gegeben und die Suspension 30 min bei RT gerührt. Das entstandene Produkt wird abfiltriert und i. vac. getrocknet [Willard und Smith, 1981].

MG: C₂₅H₄₂O₄Si (434,68 g/mol)

Ausbeute: 3,78 g (65%); weißes Pulver

Smp.: 139-142°C

Lit.[Hoffman, 1987]: 142-144°C

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.07	s	6	Si-(CH ₃) ₂
0.91-0.88	s, d überl.	12	C-(CH ₃) ₃ , C2'-CH ₃
1.20-1.17	d (J = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.90-1.64, 1.52-1.54	m	10	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H6', H7', H8'a
2.18-2.15	m	1	H1'
2.44-2.34	m	1	H2'
2.60-2.58	m	2	H3
4.31-4.23	m	2	H4, H8'
4.69-4.66	m	1	H6
5.54	m	1	H5'
5.82-5.76	m	1	H3'
5.99-5.96	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
-4.89	Si-(CH ₃) ₂
13.69	C6'-CH ₃
17.95	quart., C-(CH ₃) ₃
23.82	C2'-CH ₃
24.32	C1'-CH ₂
25.69	C-(CH ₃) ₃
27.38	C6'

δ [ppm]	Zuordnung
36.93	C5
38.87	C8'a
39.31	C3
63.58	C4
65.30	C8'
76.43	C6
128.44	C3'

30.85	C2'	130.03	C5'
33.05	C7'	131.35	quart., C4'a
35.83	C6-CH ₂	133.70	C4'
36.50	C1'	170.42	quart., C2

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	68,92	9,61	-
berechnet für C ₂₅ H ₄₂ O ₄ Si	69,08	9,74	-

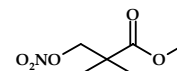
3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäuremethylester (20)

25,0 g (0,19 mol) 3-Hydroxy-2,2-dimethylpropansäuremethylester (**19**) und 0,12 g (1,99 mmol) Harnstoff werden in 250 ml DCM bei RT gelöst und anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 5°C gekühlt. 23,8 g (0,38 mol) konz. HNO₃ und 38,6 g (0,38 mol) Essigsäureanhydrid werden nacheinander unter Rühren zugetropft, wobei eine Temperatur von 10°C nicht überschritten werden darf. Der Reaktionsansatz wird bei RT über Nacht gerührt und anschließend mit 200 ml Eiswasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit 100 ml H₂O und 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und der ölige Rückstand im Feinvakuum destilliert.

MG: C₆H₁₁NO₅ (177,16 g/mol)

Ausbeute: 29,2 g (87%); hellgelbes Öl

Smp.: 67°C

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.32	s	6	C-(CH ₃) ₂
3.54	s	3	O-CH ₃
4.48	s	2	-CH ₂ -ONO ₂

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
21.41	C-(CH ₃) ₂	78.22	-CH ₂ -ONO ₂
44.56	C-(CH ₃) ₂	173.49	CO
50.98	O-CH ₃		

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	40,85	6,09	7,63
berechnet für C ₆ H ₁₁ NO ₅	40,68	6,26	7,91

3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäure (21)

Die Synthese erfolgt nach der Standardvorschrift zur Darstellung von Nitratosäuren durch alkalische Hydrolyse von Nitratostern [Hütter, 1990].

Zu 31,00 g (0,18 mol) 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropansäuremethylester (**20**), gelöst in 200 ml MeOH, wird eine Lösung von 14,00 g (0,35 mol) NaOH in 20 ml H₂O gegeben. Der Reaktionsansatz wird 2 h bei RT gerührt, mit konz. HCl neutralisiert und anschließend das Lösungsmittel i. vac. vollständig entfernt. Der verbleibende leicht gelbliche Rückstand wird in 100 ml H₂O aufgenommen und mit DCM (200 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und das erhaltene Rohprodukt aus n-Hexan umkristallisiert.

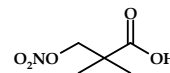
MG: C₅H₉NO₅ (163,13 g/mol)

Ausbeute: 19,70 g (69%); weißes kristallines Pulver

Smp.: 50°C

IR(KBr, cm⁻¹): 2990, 1717, 1615, 1280

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃



δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.32	s	6	C-(CH ₃) ₂
4.51	s	2	-CH ₂ -ONO ₂

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
21.92	C-(CH ₃) ₂	77.22	C-CH ₂
41.94	C-(CH ₃) ₂	180.69	CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	36,71	5,53	8,60
berechnet für C ₅ H ₉ NO ₅	36,81	5,56	8,59

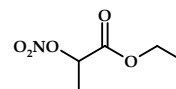
2-Nitrooxypropansäureethylester (23)

20,0 g (0,17 mol) 2-Hydroxy-propansäureethylester (**22**) und 0,12 g (1,99 mmol) Harnstoff werden in 250 ml DCM bei RT gelöst und anschließend das Reaktionsgemisch auf 5°C gekühlt. Unter Rühren werden zu dem Reaktionsansatz durch langsames Zutropfen 13,6 g (0,34 mol) konz. HNO₃ und 38,6 g (0,38 mol) Essigsäureanhydrid nacheinander zugegeben, wobei eine Temperatur von 10°C nicht überschritten werden darf. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt und anschließend mit 200 ml Eiswasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit 100 ml H₂O und 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und der ölige Rückstand im Feinvakuum destilliert.

MG: C₅H₉NO₅ (163,13 g/mol)

Ausbeute: 23,4 g (84%); farbloses Öl

Smp.: 73°C



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.26-1.23	t (J = 7.4Hz)	3	CH ₂ -CH ₃
1.46-1.44	d (J = 7.7Hz)	3	CH-CH ₃
4.14-4.10	q (J = 7.7Hz)	1	CH-CH ₃
4.46-4.21	q (J = 7.4Hz)	2	CH ₂ -CH ₃

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
13.96	CH ₂ -CH ₃	70.93	-CH-CH ₃
16.98	CH-CH ₃	165.30	CO
60.88	CH ₂ -CH ₃		

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	36,94	5,72	8,43
berechnet für C ₆ H ₁₁ NO ₅	36,81	5,56	8,59

2-Nitrooxypropansäure (24)

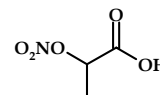
Die Synthese erfolgt nach der Standardvorschrift zur Darstellung von Nitratosäuren durch saure Hydrolyse von Nitratoestern [Hütter, 1990].

Ein Reaktionsgemisch aus 20,00 g (0.12 mol) 2-Nitrooxypropionsäureethylester (**23**) in 80 ml Dioxan wird mit 30 ml H₂O und 2,00 g (20.39 mmol) konz. H₂SO₄ versetzt und für 19 h refluxiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf die Hälfte eingengt, mit 300 ml H₂O verdünnt und durch Zusatz von NaHCO₃ auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt. Durch Extraktion mit DCM (100 ml) wird nicht umgesetzter Ester aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Die wässrige Phase wird durch Zusatz von konz. HCl auf einen pH-Wert von 1 gebracht und mit Ethylacetat (3 x 150 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und das erhaltene Rohprodukt aus n-Hexan umkristallisiert.

MG: C₃H₅NO₅ (135,08 g/mol)

Ausbeute: 10,54 g (65%); weißes dickflüssiges Öl,
kristallisiert in der Kälte aus

Smp.: 62°C

IR(KBr, cm⁻¹): 3002, 1733, 1648, 1283¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.90-0.87	d (J = 7.0 Hz)	3	CH-CH ₃
5.33-5.24	q (J = 7.25 Hz)	1	CH-CH ₃

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
14.52	CH-CH ₃	175.16	CO
75.07	CH-CH ₃		

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	27,01	3,98	10,49
berechnet für C ₂₄ H ₃₅ NO ₈	26,68	3,73	10,37

(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-Hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)propanoat (2)

3,00 g (7,00 mmol) **16** und 0,15 g (1,20 mmol) verriebenes DMAP werden in 40 ml trockenem Pyridin unter Stickstoff bei RT gelöst und anschließend auf 0°C gekühlt. 3,20 g (17,50 mmol) **33** werden über einen Zeitraum von 10 min langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h lang gerührt, die Kühlung entfernt und anschließend bei RT für weitere 24 h gerührt. Die Lösung wird mit 200 ml Diethylether verdünnt und mit 2%-iger HCl so lange gewaschen, bis die Waschlösung einen sauren pH-Wert anzeigt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit ges. NaHCO₃-Lösung (50 ml) nachgewaschen, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel wird vollständig i. vac. entfernt und der erhaltene ölige Rückstand i. vac. getrocknet.

Zur Entfernung der Schutzgruppe werden 3,50 g (6,00 mmol) des Rohproduktes in 20 ml THF gelöst und mit 0,8 ml Essigsäure und 14,2 ml TBAF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h bei RT gerührt und nach beendeter Reaktionszeit mit 200 ml Diethylether verdünnt. Die Lösung wird mit H₂O (2 × 100 ml), 2%-iger HCl (100 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (50 ml) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel mit einer Mischung aus Chloroform und Ethylacetat (10:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und der erhaltene weiße Feststoff i. vac. getrocknet.

MG: C₂₄H₃₅NO₈ (465,54 g/mol)

Ausbeute: 0,73 g (26%); weißer Feststoff

Smp.: 134-137°C

IR(KBr, cm⁻¹): 2970, 1735, 1635, 1282

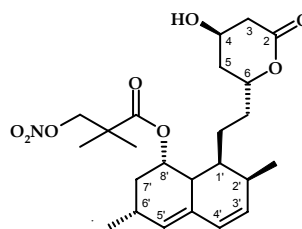
Hochauflösende MS:

gemessen:

466

berechnet für C₂₄H₃₅NO₈:

465,54

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.90-0.87	d (J = 7.5 Hz)	3	C2'-CH ₃
1.08-1.05	d (J = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.25	s	6	C-(CH ₃) ₂
2.66-1.32	m	14	H3, H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ H1', H2', H6', H7', H8'a
4.69-4.35	m	4	H4, H6, O ₂ NO-CH ₂ -C
5.42-5.41	m	1	H8'
5.51-5.50	m	1	H5'
5.81-5.75	m	1	H3'
5.99-5.95	m	1	H4'

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
13.80	C2'-CH ₃
22.23	C-(CH ₃) ₂
22.52	C-(CH ₃) ₂
23.17	C6'-CH ₃
24.31	C6'
27.13	C1'-CH ₂
30.60	C2'
32.69	C6-CH ₂
32.82	C5
36.12	C1'
36.66	C7'
37.43	C8'a

δ [ppm]	Zuordnung
38.47	C3
42.38	C-(CH ₃) ₂
62.77	C4
69.48	C8'
76.32	C6
77.93	O ₂ NO-CH ₂ -C
128.13	C4'
129.41	C5'
131.38	C3'
133.15	C4'a
170.41	C2
174.21	CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	62.04	7.92	2.89
berechnet für C ₂₄ H ₃₅ NO ₈	61.92	7.58	3.01

(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-Hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl (2S)-2-methylbutanoat (1)

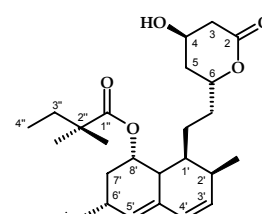
1,00 g (2,30 mmol) **16** und 0,15 g (1,20 mmol) verriebenes DMAP werden in 40 ml Chloroform unter Stickstoff bei RT gelöst und anschließend auf 0°C gekühlt. Das Reaktionsgemisch wird durch langsames Zutropfen über einen Zeitraum von 15 min mit 3,20 g (5,70 mmol) 2,2-Dimethylbutanoylchlorid (**36**) versetzt. Die Reaktionslösung wird für 1 h unter Kühlung und anschließen über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und verbleibendes Säurechlorid werden i. vac. entfernt. Der wachsartige Rückstand wird in 15 ml THF gelöst und mit 8 ml Essigsäure und 14,2 ml TBAF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h bei RT gerührt und anschließend mit 200 ml Diethylether verdünnt. Die Lösung wird mit H₂O (2 × 100 ml), 2%-iger HCl (100 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (50 ml) und ges. NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der verbleibende wachsartige Rückstand wird über Kieselgel mit einer Mischung aus Chloroform und Ethylacetat (11:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und der Rückstand i. vac. getrocknet.

MG: C₂₅H₃₈O₅ (404,54 g/mol)

Ausbeute: 0,60 g (65%); weißer Feststoff

Smp.: 137°C,

Lit. [Oh, 2007]: 135-137

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.86-0.80	t (J = 7.5 Hz)	3	H4''
0.90-0.87	d (J = 7.5 Hz)	3	C2'-CH ₃
1.10-1.07	d (J = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃

1.20	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.13	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
2.44-2.23, 2.01-1.83, 1.73-1.26	m	14	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ H1', H2', H6', H7', H8'a, H3''
2.79-2.57	m	2	H3
4.37	s	1	H4
4.67-4.59	m	1	H6
5.38-5.35	m	1	H8'
5.52-5.49	m	1	H5'
5.81-5.75	m	1	H3'
6.00-5.97	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.31	C4''
13.86	C2'-CH ₃
23.02	C6'-CH ₃
24.29	C1'-CH ₂
24.74	C2''-(CH ₃) ₂
24.77	C2''-(CH ₃) ₂
27.25	C6'
30.62	C2'
32.86	C6-CH ₂
32.94	C3''
32.98	C5
36.16	C7'
36.59	C1'

δ [ppm]	Zuordnung
37.49	C8'a
38.58	C3
43.00	quart., C2''
62.66	C4
67.99	C8'
79.32	C6
128.36	C4'
129.69	C5'
131.47	quart., C4'a
132.85	C3'
170.25	quart., C2
177.90	quart., C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	71,63	9,21	-
berechnet für C ₂₅ H ₃₈ O ₅	71,74	9,15	-

F.3.1 Nitrat-Statin-Hybride - Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1)

Die Synthesen erfolgen in Anlehnung an die Vorschrift von Hoffman *et al.* zur Acylierung von Alkoholen mit Säurechloriden [Hoffman, 1986, Methode A].

2.40 mmol des jeweiligen Statins (Simvastatin (**1**) bzw. Lovastatin (**3**)) werden in 20 ml trockenem Pyridin unter Stickstoff bei RT gelöst, mit 3.20 mmol verriebechem DMAP versetzt und das Reaktionsgemisch auf 0°C gebracht. Anschließend wird eine Lösung von 0,87 g (4.80 mmol) frisch hergestelltem **33** in 10 ml Chloroform über einen Zeitraum von 15 min langsam zu der Reaktion zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird das Reaktionsgemisch bei 0°C gehalten und mittels DC der Reaktionsverlauf kontrolliert. Bei nahezu vollständiger Umsetzung des jeweiligen Statins wird das Reaktionsgemisch mit 200 ml Diethylether verdünnt und so lange mit 2%-iger HCl gewaschen, bis das Filtrat sauer ist. Die organische Phase wird abgetrennt, mit ges. NaHCO₃-Lösung (50 ml) nachgewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel 60 mit dem in der jeweiligen Monographie angegebenen

Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch säulenchromatographisch gereinigt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, eingedampft und der Rückstand i. vac. getrocknet.

(1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-[2-((2*R*,4*R*)-4-[[2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)propanoyl]oxy]-6-oxo-tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoat (40)

Nach AAV 1 wird 1,00 g (2.40 mmol) **1** mit 0,87 g (4.80 mmol) **33** in einem Gemisch aus 20 ml Pyridin und 10 ml Chloroform umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 10:1.

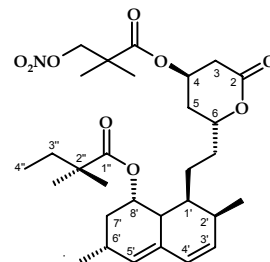
MG: $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{NO}_9$ (563,68 g/mol)

Ausbeute: 0,39 g (29%); weißer, wachsartiger Feststoff

Smp.: 82-86°C

IR(KBr, cm^{-1}): 2958, 1722, 1628, 1282

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz in CDCl_3



δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.85-0.81	t ($J = 7.5$ Hz)	3	H4''
0.90-0.89	d ($J = 7.2$ Hz)	3	C2'-CH ₃
1.10-1.09	d ($J = 7.2$ Hz)	3	C6'-CH ₃
1.13-1.12	m	6	C2''-(CH ₃) ₂
1.30	m	6	C2-(CH ₃) ₂
1.59-1.54	m	2	H3''
2.45-2.26, 1.97-1.66	m	12	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a
2.85-2.66	m	2	H3
4.46-4.42	m	1	H6
4.54-4.48	m	2	O ₂ NO-CH ₂ -C
5.30-5.28	m	1	H4
5.37-5.36	m	1	H8'
5.52	m	1	H5'
5.80-5.76	m	1	H3'
6.00-5.98	d, ($J = 8.0$ Hz)	1	H4'

$^{13}\text{C-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR-DEPT}$: 400 MHz in CDCl_3

δ [ppm]	Zuordnung
9.23	C4''
13.85	C2'-CH ₃
22.22	C-(CH ₃) ₂
22.33	C6'-CH ₃
23.00	C6'
24.19	C1'-CH ₂
24.71	C2''-(CH ₃) ₂
27.28	C2'
32.90	C6-CH ₂
32.97	C3''

δ [ppm]	Zuordnung
37.54	C8'a
42.35	quart., C2''
42.94	quart., C-(CH ₃) ₂
66.49	C8'
67.94	C4
76.59	C6
77.34	O ₂ NO-CH ₂ -C
128.43	C4'
129.79	C5'
131.47	quart., C4'a

33.14	C5
33.23	C3
35.15	C7'
36.68	C1'

132.71	C3'
168.24	quart., C2
173.46	quart., C1''
177.63	quart., CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	62,97	7,64	2,45
berechnet für C ₃₀ H ₄₅ NO ₉	63,92	8,05	2,48

(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-((2R,4R)-4-{[2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)propanoyl]oxy}-6-oxo-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl (2S)-2-methylbutanoat (41)

0,97 g (2.40 mmol) **1** werden nach AAV 1 mit 0,87 g (4.8 mmol) **33** in einem Gemisch aus 20 ml Pyridin und 10 ml Chloroform umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 12:1.

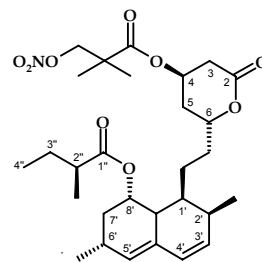
MG: C₂₉H₄₃NO₉ (549,65 g/mol)

Ausbeute: 0,52 g (40%); blassgelber, wachsartiger Feststoff

Smp.: 71-76°C

IR(KBr, cm⁻¹): 2960, 1724, 1639, 1266

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃



δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91-0.84	m	6	H4'', C2'-CH ₃
1.12-1.10	d (J = 5.0 Hz)	3	C2''-CH ₃
1.10-1.06	d (J = 7.0 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.29	s	6	C-(CH ₃) ₂
2.41-2.09, 2.03-1.36	m	15	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, H2'', H3''
2.86-2.63	m	2	H3
4.47-4.38	m	1	H6
4.54-4.57	m	2	O ₂ NO-CH ₂ -C
5.30-5.27	m	1	H4
5.38-5.37	m	1	H8'
5.23	m	1	H5'
5.81-5.75	m	1	H3'
6.01-5.98	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
11.63	C4''
13.87	C2'-CH ₃
16.02	C2''-CH ₃
22.23	C-(CH ₃) ₂
22.34	C6'-CH ₃

δ [ppm]	Zuordnung
37.28	C8'a
41.40	C6'
42.30	quart., C-(CH ₃) ₂
66.46	C8'
67.75	C4

22.79	C6'	76.56	C6
24.13	C1'-CH ₂	77.35	O ₂ NO-CH ₂ -C
26.76	C3''	128.35	C4'
27.45	C6'	129.73	C5'
30.68	C2'	131.52	quart., C4'a
32.63	C6-CH ₂	132.90	C3'
33.08	C5	168.27	quart., C2
33.17	C3	173.47	quart., C1''
35.13	C7'	176.51	quart., CO
36.62	C1'		

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	62,86	7,88	2,50
berechnet für C ₂₉ H ₄₃ NO ₉	63,37	7,89	2,55

F.3.2 Anhydro-Simvastatin- und Anhydro-Lovastatin-Derivat - Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 2)

Nach einer modifizierten Vorschrift von Giner *et al.* erfolgen die Synthesen der Eliminierungsprodukte mittels einer Dehydratisierung von tertiären Alkoholen durch Phosphorylchlorid [Giner, 1989].

Nach Giner *et al.* wird eine Lösung von Phosphorylchlorid in 5 ml trockenem Pyridin tropfenweise bei 0°C zu einer Lösung des jeweiligen Statins (**1** bzw. **3**) in 5 ml trockenem Pyridin unter Stickstoff zugegeben. Danach wird die Kühlung entfernt, der Ansatz auf 65°C erwärmt und für 5 h bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wird die Lösung mit 200 ml Diethylether verdünnt, mit 2%-iger HCl und H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel 60 mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (9:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und der Rückstand i. vac. getrocknet.

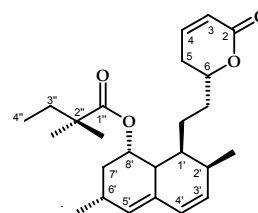
(1S,3R,7S,8S,8aR)-3,7-Dimethyl-8-{2-[(2R)-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]ethyl}-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoat (**44**)

Entsprechend der allgemeinen Vorschrift AAV 2 wird 1,00 g (2,40 mmol) **1** mit 0,44 g (2,88 mmol) Phosphorylchlorid in 10 ml Pyridin umgesetzt.

MG: C₂₅H₃₆O₄ (400,55 g/mol)

Ausbeute: 0,84 g (87%); blassgelber Feststoff

Smp.: 111-115°C



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.82-0.79	t (<i>J</i> = 7.4 Hz)	3	H4''
0.90-0.88	d (<i>J</i> = 5.0 Hz)	3	C2'-CH ₃
1.10-1.07	d (<i>J</i> = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.18	bs	6	C2''-(CH ₃) ₂
1.96-1.25	m	8	C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H7', H3''
2.44-2.18	m	6	H5, H1', H2', H6', H8'a
4.39-4.28	m	1	H6
5.39-5.31	m	1	H8'
5.52-5.50	m	1	H5'
5.80-5.74	m	1	H3'
6.04-5.97	m	2	H3, H4'
6.90-6.83	m	1	H4

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.29	C4''
13.85	C2'-CH ₃
23.02	C6'-CH ₃
24.27	C1'-CH ₂
24.76	C2''-(CH ₃) ₂
24.78	C2''-(CH ₃) ₂
27.25	C6'
29.52	C5
30.61	C2'
32.41	C6-CH ₂
32.88	C3''
32.98	C7'
36.63	C1'

δ [ppm]	Zuordnung
37.48	C8'a
42.97	quart., C2''
67.86	C8'
78.56	C6
121.49	C3
128.38	C4'
129.72	C5'
131.45	quart., C4'a
132.80	C3'
144.79	C4
164.30	quart., C2
177.70	quart., C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	74,55	8,64	-
berechnet für C ₂₅ H ₃₆ O ₄	74,96	9,06	-

(1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-3,7-Dimethyl-8-{2-[(2*R*)-6-oxo-3,6-dihydro-2*H*-pyran-2-yl]ethyl}-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl 2-methylbutanoat (45)

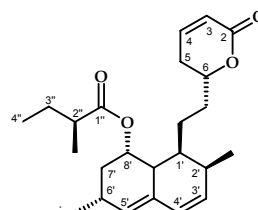
0,97 g (2,40 mmol) **3** werden nach AAV 2 mit 0,44 g (2,88 mmol) Phosphorylchlorid in 10 ml Pyridin umgesetzt.

MG: C₂₄H₃₄O₄ (386,52 g/mol)

Ausbeute: 0,74 g (80%); weißer, wachsartiger Feststoff

Smp.: 129-131°C

Lit. [Bartmann, 1986]: 128-129°C



¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91-0.86	m	6	C2'-CH ₃ , H4''
1.11-1.07	d (J = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.12-1.10	d (J = 7.0 Hz)	3	C2''-CH ₃
1.97-1.35	m	8	C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H7', H3''
2.46-2.21	m	7	H5, H1', H2', H6', H8'a, H2''
4.38-4.31	m	1	H6
5.40-5.39	m	1	H8'
5.53	m	1	H5'
5.80-5.77	m	1	H3'
6.03-5.99	m	2	H4', H3
6.88-6.84	m	1	H4

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
11.86	C4''
13.86	C2'-CH ₃
16.24	C2''-CH ₃
22.81	C6'-CH ₃
24.25	C1'-CH ₂
26.80	C3''
27.46	C6'
29.55	C3''
30.69	C2'
32.43	C6-CH ₂
32.73	C7'
36.64	C1'

δ [ppm]	Zuordnung
37.34	C8'a
41.45	C2''
67.74	C8'
78.51	C6
121.51	C3
128.34	C4'
129.67	C5'
131.98	quart., C4'a
132.98	C3'
144.73	C4
164.22	quart., C2
176.54	quart., C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	73,97	8,61	-
berechnet für C ₂₄ H ₃₄ O ₄	74,58	8,87	-

F.3.3 Acyl-Simvastatin- und Acyl-Lovastatin-Derivate - Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 3)

Die Synthesen erfolgen nach der Standardvorschrift für Acylierungen von Alkoholen über Säurechloride.

2.40 mmol des jeweiligen Statins (**1** bzw. **3**) werden in 20 ml DCM unter Stickstoff bei RT gelöst und 3.20 mmol verriebenes DMAP zugegeben. Bei 0°C wird zu dem Reaktionsansatz eine Lösung von 4.80 mmol Säurechlorid in 10 ml DCM innerhalb von 10-15 min so langsam zugetropft, dass es zu keiner Temperaturerhöhung kommt. Nach beendeter Zugabe wird das Reaktionsgemisch bei dieser Temperatur gehalten und mittels DC der Reaktionsverlauf kontrolliert. Bei nahezu vollständiger Umsetzung des Statins wird über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Säurechlorid sowie das Lösungsmittel i. vac. entfernt. Hierbei wird eine maximale Reaktionszeit von 4 h nicht überschritten. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel 60 mit dem in der jeweiligen Monographie angegebenen Lösungsmittelgemisch säulen-

chromatographisch gereinigt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, eingedampft und der Rückstand i. vac. getrocknet.

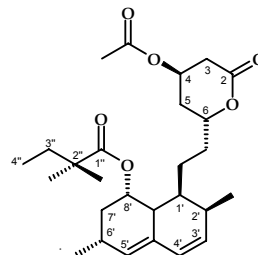
(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R)-4-(Acetyloxy)-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoat (51)

1,00 g (2.40 mmol) **1** wird nach AAV 3 mit 0,38 g (4.80 mmol) Acetylchlorid (**46**) in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 10:1.

MG: $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_6$ (460,60 g/mol)

Ausbeute: 0,69 g (63%); weißes Pulver

Smp.: 134-138°C



$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz in CDCl_3

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.85-0.79	t ($J = 7.5$ Hz)	3	H4''
0.90-0.87	d ($J = 7.0$ Hz)	3	C2'-CH ₃
1.09-1.06	d ($J = 7.0$ Hz)	3	C6'-CH ₃
1.13-1.12	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.12	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
2.35-1.25, 1.97-1.95, 1.87-1.23	m	14	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a H3''
2.08	s	3	CO-CH ₃
2.76-2.72	m	2	H3
4.51-4.44	m	1	H6
5.25-5.22	m	1	H4
5.36-5.35	m	1	H8'
5.51	m	1	H5'
5.80-5.74	m	1	H3'
6.00-5.96	m	1	H4'

$^{13}\text{C-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR-DEPT}$: 250 MHz in CDCl_3

δ [ppm]	Zuordnung
9.27	C4''
13.87	C2'-CH ₃
21.02	CO-CH ₃
23.00	C6'-CH ₃
24.37	C1'-CH ₂
24.68	C2''-(CH ₃) ₂
24.79	C2''-(CH ₃) ₂
27.25	C6'
30.62	C2'
32.83	C6-CH ₂
33.02	C3''
33.17	C5
33.30	C3
35.37	C7'

δ [ppm]	Zuordnung
36.69	C1'
37.46	C8'a
42.96	quart., C2''
65.49	C4
67.95	C8'
76.65	C6
128.40	C4'
129.75	C5'
131.44	quart., C4'a
132.74	C3'
168.69	quart., O-CO
169.96	C2
177.66	quart., C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	70,04	9,02	-
berechnet für C ₂₇ H ₄₀ O ₆	70,41	8,75	-

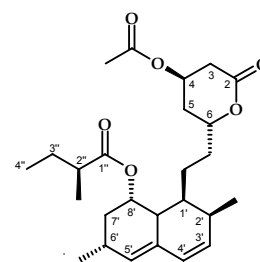
(1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-{2-[(2*R*,4*R*)-4-(Acetyloxy)-6-oxotetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1-yl (2*S*)-2-methylbutanoat (52)

Nach AAV 3 werden 0,97 g (2.40 mmol) **3** mit 0,38 g (4.80 mmol) **46** in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel n-Hexan:Ethylacetat 3:1.

MG: C₂₆H₃₈O₆ (446,58 g/mol)

Ausbeute: 0,59 g (55%); weißes Pulver

Smp.: 125-128°C



¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.92-0.87	m	6	H4'', C2'-CH ₃
1.10-1.08	d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.14-1.12	d (<i>J</i> = 8.0 Hz)	3	C2''-CH ₃
2.46-2.26, 2.05-1.28	m	15	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a H2'', H3''
2.10	s	3	CO-CH ₃
2.82-2.68	m	2	H3
4.51-4.45	m	1	H6
5.26-5.24	m	1	H4
5.40-5.39	m	1	H8'
5.54	m	1	H5'
5.81-5.77	m	1	H3'
6.02-5.99	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
11.61	C4''
13.89	C2'-CH ₃
16.23	C2''-CH ₃
21.01	CO-CH ₃
22.81	C6'-CH ₃
24.33	C1'-CH ₂
26.78	C3''
27.46	C6'
30.71	C2'
32.70	C6-CH ₂
33.18	C5
33.37	C3
35.39	C7'

δ [ppm]	Zuordnung
36.69	C1'
37.33	C8'a
41.42	C2''
65.52	C8'
67.81	C4
76.59	C6
128.37	C4'
129.72	C5'
131.56	quart., C4'a
132.93	C3'
168.64	quart., O-CO
169.94	quart., C2
176.54	quart., C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	69.89	8.71	-
berechnet für C ₂₆ H ₃₈ O ₆	69.93	8.58	-

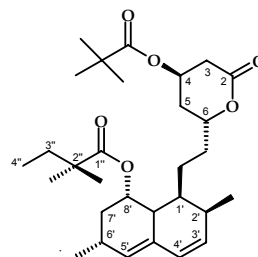
(3R,7S,8S,8aR)-8-(2-((2R,4R)-4-[(2,2-Dimethylpropanoyl)oxy]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl)-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethyl-butanoat (53)

1,00 g (2.40 mmol) **1** wird nach AAV 3 mit 0,58 g (4.80 mmol) 2,2-Dimethylpropanoylchlorid (**47**) in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 10:1.

MG: C₃₀H₄₆O₆ (502,68 g/mol)

Ausbeute: 0,75 g (62%); weißes Pulver

Smp.: 113-119°C



¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.85-0.81	t (J = 7.5 Hz)	3	H4'',
0.92-0.90	d (J = 6.9 Hz)	3	C2'-CH ₃
1.10-1.09	d (J = 7.4 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.13	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.12	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.22	s	9	C-(CH ₃) ₃
2.46-2.26, 2.05-1.28	m	14	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, H3''
2.82-2.65	m	2	H3
4.50-4.43	m	1	H6
5.25-5.23	m	1	H4
5.38-5.35	m	1	H8'
5.53-5.52	m	1	H5'
5.80-5.76	m	1	H3'
6.01-5.99	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.25	C4''
13.87	C2'-CH ₃
22.98	C6'-CH ₃
24.35	C1'-CH ₂
24.72	C6'
27.03	C-(CH ₃) ₃
27.29	C2''-(CH ₃) ₂
30.66	C2'
32.82	C6-CH ₂
33.00	C3''

δ [ppm]	Zuordnung
37.49	C8'a
38.79	quart., C-(CH ₃) ₃
42.94	quart., C2''
65.22	C8'
67.99	C4
76.70	C6
128.43	C4'
129.78	C5'
131.50	quart., C4'a
132.74	C3'

33.31	C5
33.41	C3
35.31	C7'
36.80	C1'

168.62	quart., C2
177.44	quart., C=O
177.58	quart., C-(CH ₃) ₃

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	71,98	9,01	-
berechnet für C ₃₀ H ₄₆ O ₆	71.68	9,22	-

(3R,7S,8S,8aR)-8-(2-((2R,4R)-4-[(2,2-Dimethylpropanoyl)oxy]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl)-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2-methyl-butanoat (54)

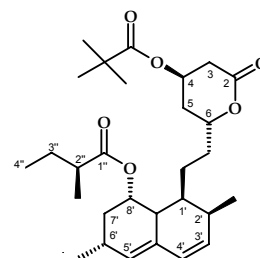
Nach AAV 3 werden 0,97 g (2.40 mmol) **3** mit 0,58 g (4.80 mmol) **47** in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 10:1.

MG: C₂₉H₄₄O₆ (488,66 g/mol)

Ausbeute: 0,70 g (60%); weißes Pulver

Smp.: 96-99°C,

Lit. [Dabak, 2003]: 95-96°C



¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.88-0.80	m	6	C26'-CH ₃ , H4'',
1.09-1.06	d (J = 7.0 Hz)	3	C6'-CH ₃ ,
1.06-1.03	d (J = 7.0 Hz)	3	C2''-CH ₃
1.17	s	9	C-(CH ₃) ₃
2.36-2.21, 2.03-1.23	m	15	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, H2'', H3''
2.80-2.59	m	2	H3
4.46-4.38	m	1	H6
5.21-5.17	m	1	H4
5.35-5.34	m	1	H8'
5.49	m	1	H5'
5.78-5.71	m	1	H3'
5.98-5.94	m	1	H4'

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
11.58	C4''
13.85	C2'-CH ₃
16.19	C2''-CH ₃
22.75	C6'-CH ₃
24.24	C6'
26.75	C1'-CH ₂
26.99	C-(CH ₃) ₃

δ [ppm]	Zuordnung
37.20	C-(CH ₃) ₃
38.75	C8'a
41.31	C2''
65.20	C8'
67.77	C4
76.65	C6
128.33	C4'

27.42	C3''
30.66	C2'
32.54	C6-CH ₂
33.20	C5
33.29	C3
35.25	C1'
36.71	C7'

129.66	C5'
131.53	C4'a
132.89	C3'
168.71	C2
176.47	CO
177.41	C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	70.67	9.30	-
berechnet für C ₂₉ H ₄₄ O ₆	71.28	9.08	-

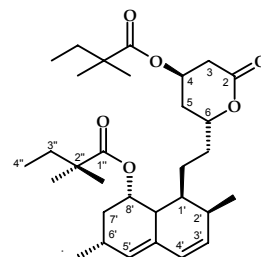
(2R,4R)-2-(2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-Dimethylbutanoyl)oxy]-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8, 8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl)-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl 2,2-dimethyl-butanoat (55)

1,00 g (2.40 mmol) **1** wird nach AAV 3 mit 0,65 g (4.80 mmol) 2,2-Dimethylbutanoylchlorid (**36**) in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 12:1.

MG: C₃₁H₄₈O₆ (516,71 g/mol)

Ausbeute: 0,56 g (45%); weißer Feststoff

Smp.: 119-123°C



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.89-0.78	m	9	C2'-CH ₃ , H4'', CH ₂ -CH ₃
1.09-1.06	d (J = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃ ,
1.15-1.07	m	12	C-(CH ₃) ₂ , C2''-(CH ₃) ₂
2.63-2.35, 2.04-1.28	m	16	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, H3'', CH ₂ -CH ₃
2.82-2.62	m	2	H3
4.48-4.41	m	1	H6
5.25-5.22	m	1	H4
5.34-5.33	m	1	H8'
5.53	m	1	H5'
5.79-5.73	m	1	H3'
6.00-5.96	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.16	CH ₂ -CH ₃
9.26	C4''
13.86	C2'-CH ₃
22.97	C6'-CH ₃
24.31	C1'-CH ₂

δ [ppm]	Zuordnung
35.34	C7'
36.70	C1'
37.42	C8'a
42.65	quart., C-(CH ₃) ₂
42.93	quart., C2''

24.43	C-(CH ₃) ₂
24.53	C-(CH ₃) ₂
24.71	C2''-(CH ₃) ₂
27.26	C6'
30.62	C2'
32.75	C6-CH ₂
32.98	C3''
33.15	CH ₂ -CH ₃
33.25	C5
33.42	C3

65.11	C8'
67.95	C4
76.71	C6
128.41	C4'
129.76	C5'
131.46	quart., C4'a
132.72	C3'
168.66	quart., C2
176.91	quart., C1''
177.57	quart., CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	66,68	8,97	-
berechnet für C ₃₁ H ₄₈ O ₆ · 1/5 CHCl ₃	66,81	8,64	-

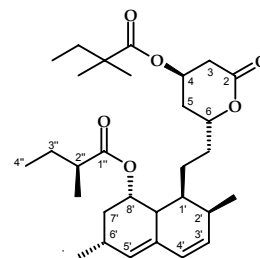
(2R,4R)-2-[2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-2,6-Dimethyl-8-(((2S)-2-methylbutanoyl)oxy)-1,2,6,7,8, 8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl 2,2-dimethyl-butanoat (56)

Nach AAV 3 werden 0,97 g (2.40 mmol) **3** mit 0,65 g (4.80 mmol) **36** in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:MeOH 10:1.

MG: C₃₀H₄₆O₆ (502,68 g/mol)

Ausbeute: 0,62 g (51%); weißes Pulver

Smp.: 132-136°C

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91-0.81	m	9	C2'-CH ₃ , H4'', CH ₂ -CH ₃
1.075	d (J = 7.5 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.10	d (J = 7.5 Hz)	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.16	s	6	C-(CH ₃) ₂
2.43-2.24, 2.06-1.41	m	17	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, H2'', H3'', CH ₂ -CH ₃
2.83-2.61	m	2	H3
4.49-4.40	m	1	H6
5.26-5.22	m	1	H4
5.38-5.37	m	1	H8'
5.53	m	1	H5'
5.81-5.79	m	1	H3'
6.02-5.98	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.19	CH ₂ - <u>C</u> H ₃
11.62	C4''
13.88	C2'- <u>C</u> H ₃
16.21	C2''- <u>C</u> H ₃
22.78	C6'- <u>C</u> H ₂
24.27	C1'- <u>C</u> H ₂
24.46	C-(<u>C</u> H ₃) ₂
24.54	C-(<u>C</u> H ₃) ₂
26.78	C3''
27.45	C6'
30.68	C2'
32.57	C6- <u>C</u> H ₂
33.17	<u>C</u> H ₂ -CH ₃
33.23	C5
33.41	C3

δ [ppm]	Zuordnung
35.35	C7'
36.68	C1'
37.24	C8'a
41.36	C2''
42.67	quart., <u>C</u> -(CH ₃) ₂
65.12	C8'
67.78	C4
76.69	C6
128.35	C4'
129.72	C5'
131.56	quart., C4'a
132.93	C3'
168.69	quart., C2
176.49	quart., C1''
176.93	quart., <u>C</u> O

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	71,47	9,08	-
berechnet für C ₃₀ H ₄₆ O ₆ *1/5 CHCl ₃	71,68	9,22	-

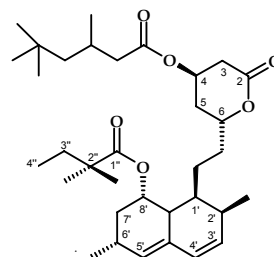
(2R,4R)-2-(2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-Dimethylbutanoyl)oxy]-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8, 8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl)-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl 3,5,5-trimethyl-hexanoat (57)

1,00 g (2.40 mmol) **1** wird nach AAV 3 mit 0,85 g (4.80 mmol) 3,5,5-Trimethylhexanoylchlorid (**48**) in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Dichlormethan:Ethylacetat 10:1.

MG: C₃₄H₅₄O₆ (558,79 g/mol)

Ausbeute: 0,12 g (9%); weißes Pulver

Smp.: 138-141°C

¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.84-0.80	t (J = 7.50 Hz)	3	H4''
0.90-0.88	d (J = 7.00 Hz)	3	C2'- <u>C</u> H ₃
0.92	s	9	C-(CH ₃) ₃
0.99-0.98	d (J = 6.65 Hz)	3	C6'- <u>C</u> H ₃
1.09-1.08	d (J = 7.40 Hz)	3	CH- <u>C</u> H ₃
1.13-1.12	d (J = 3.72 Hz)	6	C2''-(<u>C</u> H ₃) ₂
2.44-2.12, 1.89-1.65, 1.61-1.22	m	15	C- <u>C</u> H ₂ -CH ₂ , <u>C</u> H-CH ₃ , H5, C6- <u>C</u> H ₂ , C1'- <u>C</u> H ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a

1.96	m	2	H3''
2.04	m	2	CH ₂ -CO
2.81-2.66	m	2	H3
4.99-4.45	m	1	H6
5.27-5.24	m	1	H4
5.36-5.35	m	1	H8'
5.52-5.51	m	1	H5'
5.79-5.75	m	1	H3'
6.00-5.97	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.26	C4''
13.86	C2'-CH ₃
22.56	CH-CH ₃
22.99	C6'-CH ₂
24.32	C1'-CH ₂
24.71	C6'
26.99	C2''-(CH ₃) ₂
27.28	CH-CH ₃
29.95	C-(CH ₃) ₃
30.65	C2'
31.00	quart., C-(CH ₃) ₃
32.87	C6-CH ₂
33.00	C3''
33.18	C5
33.46	C3
35.46	C7'

δ [ppm]	Zuordnung
36.67	C1'
37.54	C8'a
42.94	quart., C2''
43.79	CH-CH ₂ -CH
50.54	C-CH ₂
65.17	C8'
67.94	C4
76.64	C6
128.42	C4'
129.75	C5'
131.48	quart., C4'a
132.73	C3'
168.65	quart., C2
172.05	quart., CO
177.58	quart., C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	72,92	9,88	-
berechnet für C ₃₄ H ₅₄ O ₆	73,08	9,74	-

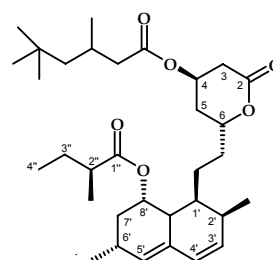
(2R,4R)-2-[2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-2,6-Dimethyl-8-[(2S)-2-methylbutanoyloxy]-1,2,6,7,8, 8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl 3,5,5-trimethyl-hexanoat (58)

Nach AAV 3 werden 0,97 g (2.40 mmol) **3** mit 0,85 g (4.80 mmol) **48** in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel n-Hexan:Ethylacetat 3:1.

MG: C₃₃H₅₂O₆ (544,76 g/mol)

Ausbeute: 0,54 g (41%); gelbes Pulver

Smp.: 127-131°C



¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.89-0.86	d (J = 7.00 Hz)	3	C2'-CH ₃
0.93-0.91	m	12	H4'', C-(CH ₃) ₃
1.01-1.00	d (J = 8.00 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.10-1.08	d (J = 7.40 Hz)	3	C2''-CH ₃
1.13-1.11	d (J = 7.00 Hz)	3	CH-CH ₃
1.24-1.22, 1.18-1.16	d (J = 8.00 Hz)	2	C-CH ₂ -CH
2.38-2.26, 2.20-2.13, 2.07-1.63, 1.54-1.27	m	18	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, H2'', H3'', CH-CH ₂ -CO, CH-CH ₃
2.82-2.64	m	2	H3
4.51-4.56	m	1	H6
5.27-5.25	m	1	H4
5.39-5.38	m	1	H8'
5.53	m	1	H5'
5.81-5.77	m	1	H3'
6.01-5.99	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
11.63	C4''
13.88	C2'-CH ₃
16.21	C2''-CH ₃
22.55	CH-CH ₃
22.80	C6'-CH ₂
24.28	C1'-CH ₂
26.78	C3''
27.02	C6'
27.47	CH-CH ₃
29.29	C-(CH ₃) ₃
30.70	C2'
31.01	quart., C-(CH ₃) ₃
32.68	C6-CH ₂
33.16	C5
33.47	C3
35.47	C7'

δ [ppm]	Zuordnung
36.64	C1'
37.34	C8'a
41.41	C2''
43.78	CH-CH ₂ -CO
50.54	CH-CH ₂ -C
65.17	C8'
67.78	C4
76.60	C6
128.37	C4'
129.72	C5'
131.57	quart., C4'a
132.91	C3'
168.66	quart., C2
172.07	quart., C1''
176.46	quart., CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	72,15	9,30	-
berechnet für C ₃₃ H ₅₂ O ₆	72,76	9,62	-

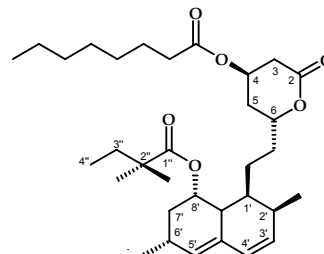
(2R,4R)-2-(2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-Dimethylbutanoyl)oxy]-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl)-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl octanoat (59)

1,00 g (2.40 mmol) **1** wird nach AAV 3 mit 0,78 g (4.80 mmol) Octanoylchlorid (**49**) in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel n-Hexan:Ethylacetat 4:1.

MG: C₃₃H₅₂O₆ (544,72 g/mol)

Ausbeute: 0,83 g (64%); weißer Feststoff

Smp.: 137-139°C



¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.85-0.82	t (J = 7.4 Hz)	3	H4''
0.90-0.89	m	6	C2'-CH ₃ , CH-CH ₃
1.10-1.08	d (J = 10.2 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.13	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.14	s	3	C2''-(CH ₃) ₂
1.32-1.13, 2.37-2.25, 2.08-2.04, 1.87-1.41	m	23	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H6', H8'a, H3'', H ₃ C-(CH ₂) ₄ -, (CH ₂) ₂ -CO
2.45-2.44	m	1	H2'
1.98-1.95	m	2	H7'
2.81-2.67	m	2	H3
4.51-4.445	m	1	H6
5.27-5.24	m	1	H4
5.37-5.36	m	1	H8'
5.52-5.51	m	1	H5'
5.80-5.76	m	1	H3'
6.01-5.99	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
9.28	C4''
13.87	CH ₂ -CH ₃
14.01	C2'-CH ₃
22.55	C6'-CH ₂
22.99	CH ₂ -CH ₃
24.33	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
24.71	C6'
24.77	C2'-CH ₃
24.81	C1'-CH ₂
27.26	C2''-(CH ₃) ₂
28.85	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
29.03	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
30.63	C2'
31.60	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
32.82	C6-CH ₂

δ [ppm]	Zuordnung
33.36	C5
34.27	C3
35.43	C7'
36.69	C1'
37.47	C8'a
42.96	quart., C2''
65.19	C8'
67.96	C4
76.68	C6
128.40	C4'
129.76	C5'
131.45	quart., C4'a
132.74	C3'
168.76	quart., C2
172.83	quart., CO

33.08	C3''	177.64	quart., C1''
33.19	<u>C</u> H ₂ -CO		

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	72,07	10,01	-
berechnet für C ₃₃ H ₅₂ O ₆	72,76	9,62	-

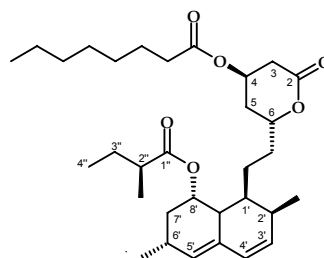
(2R,4R)-2-[2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-2,6-Dimethyl-8-[[[(2S)-2-methylbutanoyl]oxy]-1,2,6,7,8, 8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl octanoat (60)

Nach AAV 3 werden 0,97 g (2.40 mmol) **3** mit 0,78 g (4.80 mmol) **49** in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel n-Hexan:Ethylacetat 12:1.

MG: C₃₂H₅₀O₆ (530,74 g/mol)

Ausbeute: 1,10 g (87%); weißes Pulver

Smp.: 139-142°C

¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.85-0.82	m	9	CH ₂ -CH ₃ , H4'', C2'-CH ₃
1.06-1.02	d (J = 10.0 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.09-1.06	d (J = 7.5 Hz)	3	C2''-CH ₃
2.40-2.23, 2.05-1.39, 1.27	m	27	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a, CH ₂ -CO, H ₃ C-(CH ₂) ₅ , H2'', H3''
2.79-2.60	m	2	H3
4.47-4.40	m	1	H6
5.22-5.20	m	1	H4
5.35-5.33	m	1	H8'
5.49	m	1	H5'
5.77-5.71	m	1	H3'
5.97-5.94	m	1	H4'

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
11.61	C4''	33.34	C5
13.86	CH ₂ -CH ₃	34.26	C1'
14.00	C2'-CH ₃	35.40	C3
16.23	C2''-CH ₃	36.23	C7'
22.54	CH ₂ -CH ₃	37.25	C8'a
22.78	C6'-CH ₃	41.39	C2''
24.26	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	65.19	C8'
24.80	C1'-CH ₂	67.80	C4

26.77	C3''
27.43	C6'
28.83	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
29.01	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
30.66	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂
31.59	C2'
32.60	C6-CH ₂
33.14	CH ₂ -CO

76.63	C6
128.34	C4'
129.70	C5'
131.54	C4'a
132.93	C3'
168.79	C2
172.84	CO
176.57	C1''

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	72.15	9.54	-
berechnet für C ₃₂ H ₅₀ O ₆	72.42	9.50	-

Dinitrat-Simvastatin-Derivat (74)

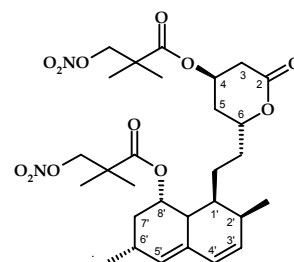
1,00 g (3,12 mmol) Diol-Lacton (**15**) und 0,30 g (2,40 mmol) verriebenes DMAP werden in 20 ml trockenem Pyridin unter Stickstoff bei RT gelöst und anschließend auf 0°C gekühlt. 1,60 g (9,36 mmol) des frisch hergestellten 3-Nitrooxy-2,2-dimethylpropanoylchlorids (**33**) werden über einen Zeitraum von 10 min langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h lang gerührt, die Kühlung entfernt und anschließend bei RT für weitere 24 h gerührt. Die Lösung wird mit 200 ml Diethylether verdünnt und Pyridin so lange mit 2%-iger HCl zerstört, bis die Waschlösung einen sauren pH-Wert anzeigt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit H₂O (100 ml) und ges. NaHCO₃-Lösung (50 ml) nachgewaschen, über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und das Rohprodukt als gelbliches Öl erhalten. Das erhaltene Öl wird über Kieselgel mit einer Mischung aus n-Hexan und Ethylacetat (5:2) säulenchromatographisch gereinigt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und das Produkt i. vac. getrocknet.

(2R,4R)-2-[2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-8-{[2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)propanoyl]oxy}-2,6-di-methyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl 2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)propanoat (74)

MG: C₂₉H₄₂N₂O₁₂ (610,65 g/mol)

Ausbeute: 1,09 g (57%); leicht bräunlicher Feststoff

Smp.: 101-107°C

IR(KBr, cm⁻¹): 2964, 1722, 1638, 1281¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91-0.88	d (J = 7.0 Hz)	3	C2'-CH ₃
1.19-1.17	d (J = 7.0 Hz)	3	C6'-CH ₃
1.32	s	6	C-(CH ₃) ₂
1.29	s	6	C-(CH ₃) ₂
2.49-2.04, 1.91-1.79, 1.60-1.38	m	12	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a
2.87-2.72	m	2	H3

4.25-4.24	m	1	H6
4.52-4.50	m	5	H4, 2-CH ₂ -ONO ₂
5.31-5.27	m	1	H8'
5.43	m	1	H5'
5.82-5.76	m	1	H3'
5.99-5.96	m	1	H4'

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
13.94	C2'-CH ₂
22.23	C-(CH ₃) ₂
22.28	C-(CH ₃) ₂
22.33	C-(CH ₃) ₂
22.38	C-(CH ₃) ₂
23.79	C6'-CH ₃
24.13	C6'
27.36	C1'-CH ₂
30.80	C5
32.94	C2'
33.14	C6-CH ₂
35.12	C8'
35.78	C3
36.45	C7'
38.77	C8'a

δ [ppm]	Zuordnung
41.84	C-(CH ₃) ₃
42.30	C-(CH ₃) ₃
65.33	C8'
66.61	C4
76.59	C6
77.32	CH ₂ -ONO ₂
77.51	CH ₂ -ONO ₂
128.47	C4'
130.11	C5'
131.24	C3'
133.55	C4'a
168.62	C2
173.51	CO
179.12	CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	56.38	7.45	3.96
berechnet für C ₂₉ H ₄₂ N ₂ O ₁₂	57.04	6.93	4.59

Dipivaloyl-Statin-Derivat (75)

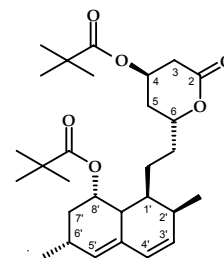
1,00 g (3,12 mmol) **15** und 0,30 g (2,40 mmol) verriebenes DMAP werden in 20 ml trockenem Chloroform unter Stickstoff bei RT gelöst und anschließend auf 0°C gekühlt. 1,12 g (9,36 mmol) **47** werden über einen Zeitraum von 10 min langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 1 h lang gerührt, die Kühlung entfernt und anschließend bei RT für weitere 24 h gerührt. Das Lösungsmittel und verbleibendes Säurechlorid werden i. vac. vollständig entfernt. Das erhaltene Öl wird über Kieselgel mit einer Mischung aus Chloroform und MeOH (20:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und der Rückstand i. vac. getrocknet.

(2R,4R)-2-(2-((1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-Dimethylpropanoyl)oxy]-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8, 8a-hexahydronaphthalen-1-yl)ethyl)-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl pivalate (75)

MG: $C_{29}H_{44}O_6$ (488,66 g/mol)

Ausbeute: 0,52 g (35%); weißer Feststoff

Smp.: 114-121°C



1H -NMR: 250 MHz in $[d_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.84-0.81	d ($J = 7.0$ Hz)	3	C2'-CH ₃
1.02-0.99	d ($J = 7.0$ Hz)	3	C6'-CH ₃
1.08	s	9	C-(CH ₃) ₃
1.14	s	9	C-(CH ₃) ₃
2.47-2.33, 1.90-1.14	m	12	H5, C6-CH ₂ , C1'-CH ₂ , H1', H2', H6', H7', H8'a
2.91-2.50	m	2	H3
4.37	m	1	H6
5.14-5.10	m	2	H4, H8'
5.49	m	1	H5'
5.79-5.74	m	1	H3'
5.96-5.93	m	1	H4'

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[d_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
14.80	C2'-CH ₃
23.87	C6'-CH ₃
24.50	C1'-CH ₂
27.86	C-(CH ₃) ₃
28.15	C-(CH ₃) ₃
28.22	C6'
31.38	C2'
33.05	C6-CH ₂
33.27	C5
33.40	C1'
36.08	C3
37.67	C7'

δ [ppm]	Zuordnung
39.44	C8'a
66.12	C8'
68.22	C4
76.35	C6
128.66	C4'
129.57	C5'
131.98	C4'a
133.41	C3'
168.97	C2
176.95	CO
177.52	CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	68,47	8,99	-
berechnet für $C_{29}H_{44}O_6 \cdot 1/5 CDCl_3$	68,43	8,69	-

2,2-Dimethylbutanoyl-Diol-Derivat (76)

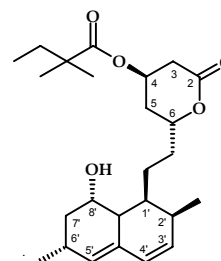
Nach AAV 3 wird 1,00 g (3.1 mmol) **15** mit 0,40 g (3.1 mmol) **36** in 20 ml DCM umgesetzt. Reinigung durch Säulenchromatographie, Fließmittel Chloroform:Diethylether 10:1.

(2R,4R)-2-{2-[(1S,2S,6R,8S,8aR)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl}-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl 2,2-dimethyl-butanoat (76)

MG: $C_{25}H_{38}O_6$ (418,57 g/mol)

Ausbeute: 0,20 g (15%); weißes Feststoff

Smp.: 78-82°C



$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz in CDCl_3

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.92-0.81	m	6	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{C}2'\text{-CH}_3$
1.20-1.16	m	9	$\text{C-(CH}_3)_2$, $\text{C}6'\text{-CH}_3$
2.49-2.30, 2.20-2.05, 1.91-1.79, 1.64-1.50	m	14	$\text{H}_3\text{C-CH}_2$, H5, $\text{C}6\text{-CH}_2$, $\text{C}1'\text{-CH}_2$, H1', H2', H6', H7', H8'a
2.84-2.63	m	2	H3
4.25-4.22	m	1	H8'
4.58-4.52	m	1	H6
5.27-5.23	m	1	H4
5.56-5.34	m	1	H5'
5.83-5.76	m	1	H3'
6.00-5.96	m	1	H4'

$^{13}\text{C-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR-DEPT}$: 250 MHz in CDCl_3

δ [ppm]	Zuordnung
9.20	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$
13.95	$\text{C}6'\text{-CH}_3$
23.84	$\text{C}2'\text{-CH}_2$
24.21	$\text{C}1'\text{-CH}_2$
24.46	$\text{C}6'$
24.55	$\text{C-(CH}_3)_2$
27.35	$\text{C}2'$
33.05	$\text{C}7'$
33.18	$\text{C}6\text{-CH}_2$
33.39	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$
35.36	$\text{C}5$
35.81	$\text{C}3$

δ [ppm]	Zuordnung
36.46	$\text{C}1'$
42.69	quart., $\text{C-(CH}_3)_2$
50.84	$\text{C}8'a$
65.21	$\text{C}8'$
65.31	$\text{C}4$
76.69	$\text{C}6$
128.46	$\text{C}3'$
130.10	$\text{C}5'$
130.11	quart., $\text{C}4'a$
133.60	$\text{C}4'$
177.01	$\text{C}2$
182.88	CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	71,42	9,15	-
berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_6$	71,74	9,01	-

Relactonisierung des Atorvastatin-Calciums (78)

In Anlehnung an die Patentschrift von O'Sullivan und O'Neill werden 2,00 g (1.73 mmol) Atorvastatin-Calcium (**77**) in 50 ml H₂O suspendiert, auf 0°C gebracht und mit 5 ml konz. HCl versetzt. Die Suspension wird in Diethylether (3 × 100 ml) extrahiert, mit H₂O (3 × 100 ml) und ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. vac. entfernt.

Das verbleibende blassgelbe Öl wird in 100 ml Toluol gelöst und 3 h im Wasserabscheider zur Entfernung von azeotropem H₂O unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird vollständig abdestilliert und der verbleibende Rückstand aus 30 ml n-Hexan umkristallisiert. Das Produkt wird über Nacht in der Kälte ausgefällt, abfiltriert und i. vac. getrocknet.

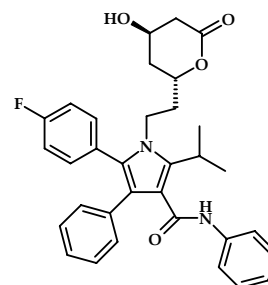
(4R,6R)-6-{2-[2-(4-Fluorophenyl)-5-isopropyl-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)pyrrol-1-yl]ethyl}-4-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-on (78)

MG: C₃₃H₃₃FN₂O₄ (540,63 g/mol)

Ausbeute: 0,57 g (61%); weißer Feststoff

Smp.: 157-161°C

Lit. [Baumann, 1992]: 159-160°C



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.56-1.51	m	6	CH-(CH ₃) ₂
1.96-1.76	m	3	CH-CH ₂ , CH-CH ₂
2.71-2.51	m	2	CH ₂ -CO
4.09-3.99	m	2	CH-(CH ₃) ₂ , CH-OH
4.32-4.29	m	2	N-CH ₂
4.57-4.49	m	2	CH ₂ -O
7.21-6.98	m	14	arom.

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
21.68	CH-(CH ₃) ₂
21.98	CH-(CH ₃) ₂
26.16	CH-(CH ₃) ₂
35.64	CH ₂ -CH
37.14	CH ₂ -CO
38.48	N-CH ₂
40.73	CH ₂ -O
62.46	CH-CH ₂
72.98	CH-OH
115.44	arom.
115.67	quart., Pyrrol-C2
115.78	arom.
119.68	arom.
122.09	quart., Pyrrol-C4

δ [ppm]	Zuordnung
127.96	quart., arom.
128.02	quart., arom.
128.37	arom.
128.68	arom.
128.74	quart., arom.
130.39	arom.
133.01	arom.
133.14	arom.
134.40	quart., Pyrrol-C5
138.21	quart., arom.
141.33	quart., Pyrrol-C2
160.37	quart., arom. C-F
164.31	quart., C-O
166.09	quart., arom. C-F

123.67	arom.	169.19	quart., C-O
126.65	arom.		

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	72,98	6,31	5,00
berechnet für C ₁₄ H ₁₂ ClIN ₂ O ₅	73,31	6,15	5,18

F.3.4 Clioquinol-Derivate - Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 4)

Clioquinol (**79**) wird in einem Gemisch aus 20 ml DCM und 20 ml trockenem Pyridin unter Stickstoff bei RT gelöst. Zu der gelblichen Suspension werden 6,40 mmol DMAP gegeben. Nach einem Farbumschlag des Reaktionsansatzes zu orangefarben wird eine Lösung mit 2 Äquivalenten Säurechlorid in 10 ml DCM über einen Zeitraum von 15 min langsam zugetropft. Nach Entfärbung der Lösung wird die Reaktion mit 100 ml Diethylether verdünnt und mit 0.2%-iger HCl gewaschen, bis das Filtrat einen sauren pH-Wert zeigt. Die organische Phase wird mit 150 ml H₂O, ges. NaHCO₃-Lösung (50 ml) und ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Das verbleibende orangefarbene Öl wird über Kieselgel 60 mit einer Mischung aus n-Hexan und Ethylacetat (6:1) gereinigt.

5-Chloro-7-iodoquinolin-8-yl 2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)propanoat (**80**)

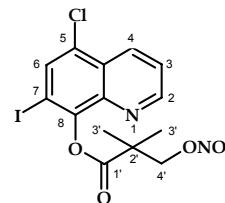
0,75 g (2,47 mmol) **79** werden nach AAV 4 mit 0,87 g (4,80 mmol) **33** in einem Gemisch aus 20 ml DCM und 20 ml Pyridin umgesetzt.

MG: C₁₄H₁₂ClIN₂O₅ (450,61 g/mol)

Ausbeute: 0,91 g (82%); weißes Pulver

Smp.: 167-171°C

IR(KBr, cm⁻¹): 1761, 1631, 1574, 1280



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.62	s	6	H3'
4.93-4.75	m	2	H4'
7.56-7.51	q (J = 4.2 Hz)	1	arom., H3
7.98	s	1	arom., H6
8.51-8.47	dd (J = 7.7 Hz, 1.7 Hz)	1	arom., H4
8.87-8.85	dd (J = 2.7 Hz, 1.6 Hz)	1	arom., H2

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
22.46	C3'
22.56	C3'
42.74	quart., C2'
77.52	C4'
89.72	quart., arom., C7
122.78	arom., C3
127.03	quart., arom., C4a

δ [ppm]	Zuordnung
129.40	quart., arom., C5
133.12	arom., C6
134.43	arom., C4
141.03	quart., arom., C8a
148.00	quart., arom., C8
151.55	arom., C2
171.75	quart., C1'

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	37,72	2,61	6,17
berechnet für C ₁₄ H ₁₂ ClIN ₂ O ₅	37,32	2,68	6,22

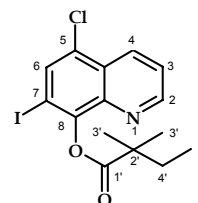
5-Chloro-7-iodoquinolin-8-yl 2,2-dimethylbutanoat (81)

0,75 g (2,47 mmol) **79** werden nach AAV 4 mit 0,65 g (4,80 mmol) **36** in einem Gemisch aus 20 ml DCM und 20 ml Pyridin umgesetzt.

MG: C₁₅H₁₅ClINO₂ (403,64 g/mol)

Ausbeute: 0,79 g (79%); weißer Feststoff

Smp.: 173-176°C

¹H-NMR: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.07-1.11	t(J = 7.5 Hz)	3	H5'
1.39	s	3	H3'
1.42	s	3	H3'
1.85-1.78	m	2	H4'
7.72-7.76	q(J = 4.2 Hz)	1	arom., H3
8.20	s	1	arom., H6
8.53-8.56	dd(J = 7.1 Hz, 1.4 Hz)	1	arom., H4
8.85-8.87	dd(J = 2.6 Hz, 1.5 Hz)	1	arom., H2

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 400 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
14.46	C5'
29.76	C3'
30.16	C3'
38.04	C4'
47.88	quart., C2'
97.10	quart., arom., C7
128.70	arom., C3
131.36	quart., arom., C4a

δ [ppm]	Zuordnung
133.21	quart., arom., C5
138.11	arom., C6
139.57	arom., C4
145.88	quart., arom., C8a
153.47	quart., arom., C8
157.19	arom., C2
179.80	quart., C1'

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	45,02	3,70	8,51
berechnet für C ₁₅ H ₁₅ ClINO ₂	44,63	3,75	8,78

F.3.5 Butyrolacton-Derivat (84)

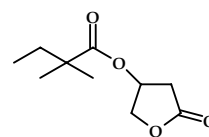
5-Oxotetrahydrofuran-3-yl 2,2-dimethylbutanoat (84)

0,50 g (4.89 mmol) 3-Hydroxy- γ -butyrolacton (**82**) werden in 20 ml DCM unter Stickstoff bei RT gelöst und mit 6.20 mmol DMAP versetzt. Bei 0°C wird zu dem Reaktionsgemisch eine Lösung von 4.80 mmol Säurechlorid in 10 ml DCM innerhalb von 15 min so langsam zugetropft, dass es zu keiner Temperaturerhöhung kommt. Das Reaktionsgemisch wird für 1 h unter Kühlung und anschließend bei RT über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Säurechlorid werden i. vac. abgedampft. Das verbleibende dunkelbraune Öl wird durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60 mit einem Gemisch aus n-Hexan und Ethylacetat (5:1) gereinigt. Die Detektion des Produktes mittels DC-Kontrolle erfolgt hierbei über Sprühreagenz (Vanillin/H₂SO₄). Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingedampft und das Produkt i. vac. getrocknet.

MG: C₁₀H₁₆O₄ (200,23 g/mol)

Ausbeute: 0,15 g (15%); hellgelbes Pulver

Smp.: 115-118°C



¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.87-0.81	t ($J = 7.5$ Hz)	3	CH ₂ -CH ₃
1.16	s	6	C-(CH ₃) ₂
1.62-1.53	m	2	C-CH ₂ -CH ₃
2.92-2.55	m	2	CO-CH ₂ -CHO
4.56-4.30	m	2	O-CH ₂ -CHO
5.45-5.40	m	1	CH ₂ -CHO-CH ₂

¹³C-NMR und ¹³C-NMR-DEPT: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
9.15	CH ₂ -CH ₃	42.52	quart., C-(CH ₃) ₂
24.39	C-CH ₃	69.44	O-CH ₂ -CHO
24.42	C-CH ₃	73.16	CH ₂ -CHO-CH ₂
33.06	C-CH ₂ -CH ₃	174.50	quart., CO
34.52	CO-CH ₂ -CHO	177.41	quart., CO

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	60,31	8,42	-
berechnet für C ₁₀ H ₁₆ O ₄	59,98	8,05	-

F.4 Untersuchungen der A β -Aggregation und deren direkten Inhibition

F.4.1 Allgemeine Angaben zu Materialien und Methoden

Alle Reagenzien werden mit Aq. bidest. hergestellt.

Phosphatpuffer pH 8 (0,1 M)

3,4334 g Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) und 0,1270 g Natriumdihydrogenphosphat x 2 H₂O (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 200 ml H₂O gelöst. Die Lösung wird mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 8 eingestellt und auf 250,0 ml mit H₂O aufgefüllt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Für die Messungen mit Zn²⁺- und Cu²⁺-Ionen wurden jeweils 5 mM Stammlösungen des jeweiligen Ions in dem Phosphatpuffer hergestellt und zur Messung 1:100 verdünnt.

Thioflavin T-Lösung (THT-Lösung) (15 μ M)

0,5 mg THT (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 1,0 ml H₂O gelöst. Davon werden 10 μ l auf 1,0 ml mit Phosphatpuffer verdünnt.

Hexafluoro-2-propanol (HFIP)

(Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland))

A β -Lösung (150 μ M)

A β ₄₀ wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Marcus Fändrich (Max-Planck-Institut Halle/Saale) zur Verfügung gestellt.

0,65 mg mit HFIP behandeltes A β ₄₀ wird in 160 μ l DMSO (99,9%; Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) 5-10 s unter vorsichtigem Mischen mit dem Vortexer gelöst und anschließend 840 μ l Phosphatpuffer zugeben und vorsichtig gemischt.

Inhibitor-Lösung

Von den Testsubstanzen wurden jeweils Stammlösungen mit einer Konzentration von 10⁻² M in DMSO hergestellt. Vor jeder Messung wurden aus diesen Stammlösungen je 25 μ l mit 975 μ l Phosphatpuffer auf eine Konzentration von 2,5x10⁻⁴ M verdünnt.

Fluorimeter

NOVOstar Microplate-Reader, BMG Labtechnologies GmbH (Offenburg, Deutschland)

Einstellungen: Exzitation: 450 nm; Emission: 490 nm; Shake width (mm): 1,0; Shake mode: orbital; Additional shaking: 20 s before each cycle; Temperatur: 37°C

F.4.2 Versuchsdurchführung

Nach dem Desaggregationsprotokoll von Klein wird A β ₄₀ vor der eigentlichen Versuchsdurchführung in seine monomere Form überführt [Klein, 2002]. Hierzu wird das bei -80°C gelagerte A β und HFIP für 15 min auf Eis gelegt. A β wird nun in ein nicht beschichtetes Glasgefäß eingewogen und gekühltes HFIP zugegeben, so daß eine 1 mM Lösung (z. B. 1,76 mg A β ₄₀ in 1,015 ml HFIP) entsteht. Nach vollständiger Lösung des Peptides wird das geschlossene Gefäß für eine Stunde bei RT stehen gelassen. Die Lösung verbleibt unverschlossen über Nacht bei RT und das noch verbliebene HFIP wird am nächsten Morgen am Rotationsverdampfer

bei RT 10 min lang bei 0 bar entfernt. Es soll ein klarer dünner A β -Film entstehen, welcher nun wieder bei -80°C für mehrere Monate gelagert werden kann.

Die Experimente werden in einer 96well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Bei allen Experimenten wird ein Blindwert (45 μ l Puffer und 5 μ l THT) mitgeführt. Die Proben enthalten 5 μ l THT, die weiteren Volumina ergeben sich aus den jeweiligen Konzentrationen und der Zusammensetzung der Proben (25 μ l A β , 20 μ l Inhibitor bzw. Phosphatpuffer für die Kontrolle). Letztendlich werden sie mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Jede Probe wird vier- bis achtfach auf einer 96well-Platte und in 2-3 unabhängigen Experimenten wiederholt. Hierbei wird die Reihenfolge der Pipettierung in jedem Experiment beibehalten, zuerst werden Puffer und THT, anschließend eventuell der zu untersuchende Inhibitor und zuletzt A β zugegeben. Die 96well-Platte wird dann im Fluorimeter bei 37°C für 90 h inkubiert und halbstündlich vermessen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt mit den Programmen GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.) und Microcal(TM) Origin® (Microcal Software, Inc.).

Die elektronenmikroskopischen Proben werden durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat (2%-ige Lösung) vorbereitet. Die Untersuchungen wurden am Elektronen-mikroskopischen Zentrum (EMZ) des Universitätsklinikums Jena am Transmissionselektronenmikroskop Zeiss-CEM 902A (Auflösung: 0,6 nm) durchgeführt. Die Abbildungen werden mit Hilfe der TVIPS FastScann CCD-Kamera aufgenommen.

G Abkürzungsverzeichnis

[d ₆]-DMSO	deuteriertes Dimethylsulfoxid
Aβ	beta-Amyloid
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer's Disease, Alzheimersche Erkrankung
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein (Amyloid-Vorläufer-Protein)
Aq. bidest.	bidestilliertes Wasser
arom.	aromatisch
BACE	β-site APP-cleaving enzyme
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CDI	1,1'-Carbodiimidazol
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CYP	Cytochrom
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DEPT	Distortionless Enhancement of NMR signals by Polarization Transfer
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid- hydrochlorid
et al.	et alii (und andere)
FM	Fließmittel
g	Gramm
ges.	gesättigt
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure

HFIP	Hexafluoroisopropanol
HNO ₃	Salpetersäure
Hz	Hertz
i. vac.	im Vakuum
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IR	Infrarot
ISDN	Isosorbiddinitrat
5-ISMN	Isosorbid-5-mononitrat
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
konz.	konzentriert
LDL	low-density lipoprotein
LiOH	Lithiumhydroxid
Lit.	Literatur
M	Molarität
m	Multipllett
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMSE	Mini Mental Status Examination
MMST	Mini Mental Status Test
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NaCO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	NO-Synthase
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppm	parts per million
q	Quartett
RF	Rückfluss
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Singulett
s.	siehe
sAPP	“lösliches” (soluble) APP-Fragment
sGC	lösliche Guanylatzyklase
Smp	Schmelzpunkt
SOCl ₂	Thionylchlorid
sog.	sogenannte
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMSCI	tert-Butyldimethylsilylchlorid
THF	Tetrahydrofuran
THT	Thioflavin T
u. a.	unter anderem
überl.	überlagert
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentralnervensystem
δ	chemische Verschiebung
μM	mikromolar

H Literaturverzeichnis

Aisen P.S., Saumier D., Briand R., Laurin J., Gervais F., Tremblay P., Garceau D.: A PHASE II STUDY TARGETING AMYLOID- β WITH 3APS IN MILD-TO-MODERATE ALZHEIMER DISEASE; *Neurology*, **2006**, 67, 1757-1763

Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., Finch C.E., Frautschy S., Griffin W.S.T., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L.-F., Mrak R., Mackenzie I.R., McGeer P.L., O'Banion K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F.L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T.: INFLAMMATION AND ALZHEIMER'S DISEASE; *Neurobiol Aging*, **2000**, 21, 283-421

Alberts A.W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffmann C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J.: MEVINOLIN: A HIGHLY POTENT COMPETITIVE INHIBITOR OF HYDROXYMETHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE AND CHOLESTEROL-LOWERING AGENT; *Proc Natl Acad Sci USA*, **1980**, 77, 3957-3961

Askin D., Verhoeven T.R., Liu T.M.H., Shinkai I.: SYNTHESIS OF SYNVINOLIN: EXTREMELY HIGH CONVERSION ALKYLATION OF AN ESTER ENOLATE; *J Org Chem*, **1991**, 56, 4929-4932

Atwood C.S., Moir R.D., Huang X., Scarpa R.C., Bacarra N.M.E., Romano D.M., Hartshorn M.A., Tanzi R.E., Bush A.I.: DRAMATIC AGGREGATION OF ALZHEIMER A β BY CU(II) IS INDUCED BY CONDITIONS REPRESENTING PHYSIOLOGICAL ACIDOSIS; *J Biol Chem*, **1998**, 273, 12817-12826

Ballard C.G: ADVANCES IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE: BENEFITS OF DUAL CHOLINESTERASE INHIBITION; *Eur Neurol*, **2002**, 47, 64-70

Ballatore C., Lee V.M-Y., Trojanowski J.Q.: TAU-MEDIATED NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED DISORDERS; *Nat Rev Neurosci*, **2007**, 8, 663-672

Bandarage U.K., Janero D.R.: NITRIC OXIDE-RELEASING NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS: NOVEL GASTROINTESTINAL-SPARING DRUGS; *Mini Rev Med Chem*, **2001**, 1, 57-70

Bandarage U.K., Chen L., Fang X., Garvey D.S., Glavin A., Janero D.R., Letts L.G., Mercer G.J., Saha J.K., Schroeder J.D., Shumway M.J., Tam S.W.: NITROSOTHIOL ESTERS OF DICLOFENAC: SYNTHESIS AND PHARMALOGICAL CHARACTERIZATION AS GASTROINTESTINAL-SPARING PRODRUGS; *J Med Chem*, **2000**, 43, 4005-4016

Bartmann W., Beck G., Granzer E., Jendralla H., v. Kerekjarto B., Wess G.: CONVENIENT TWO-STEP STEREOSPECIFIC HYDROXY-SUBSTITUTION WITH RETENTION IN β -HYDROXY- δ -LACTONES; *Tetrahedron Lett*, **1986**, 27, 4709-4712

Bartolini M., Bertucci C., Bolognesi M.L., Cavalli A., Melchiorre C., Andrisano V.: INSIGHT INTO THE KINETIC OF AMYLOID β (1-42) PEPTIDE SELF AGGREGATION: ELUCIDATION OF INHIBITORS' MECHANISM OF ACTION; *Chem Bio Chem*, **2007**, 8, 2152-2161

Bartolini M., Bertucci C., Cavrini V., Andrisano V.: β -AMYLOID AGGREGATION INDUCED BY ACETYLCHOLINESTERASE: INHIBITION STUDIES; *Biochem Pharmacol*, **2003**, 65, 407-416

Baumann K.L., Butler D.E., Deering C.F., Mennen K.E., Millar A., Nanninga T.N., Palmer C.W., Roth B.D.: THE CONVERGENT SYNTHESIS OF CI-981 AN OPTICALLY ACTIVE, HIGHLY POTENT, TISSUE SELECTIVE INHIBITOR OF HMG-CoA REDUCTASE; *Tetrahedron Lett*, **1992**, 33, 2283-2284

Beckmann J.S., Chen J., Crow J.P., Ye Y.Z.: REACTIONS OF NITRIC OXIDE; SUPEROXIDE AND PEROXYNITRITE WITH SUPEROXIDE DISMUTASE IN NEURODEGENERATION; *Prog Brain Res*, **1994**, 103, 371-380

Behl C.: ALZHEIMER'S DISEASE AND OXIDATIVE STRESS: IMPLICATIONS FOR NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES; *Prog Neurobiol*, **1999**, 57, 301-323

Bodovitz S., Klein W.: CHOLESTEROL MODULATES α -SECRETASE OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN; *J Biol Chem*, **1996**, 271, 4436-4440

- Bottorff M.B.: SAFETY AND STATINS: PHARMACOLOGIC AND CLINICAL PERSPECTIVES; *Prev Med Manag Care*, **2004**, 4, 30-37
- Brunelli S., Rovere-Querini P., Sciorati C., Manfredi A.A., Clementi E.: NITRIC OXIDE: EMERGING CONCEPTS ABOUT ITS USE IN CELL-BASED THERAPIES; *Expert Opin Investig Drugs*, **2007**, 19, 33-43
- Brunner H., Cockcroft J.R., Deanfield J.: ENDOTHELIAL FUNCTION AND DYSFUNCTION. PART II: ASSOCIATION WITH CARDIOVASCULAR RISK FACTORS AND DISEASES. A STATEMENT BY THE WORKING GROUP ON ENDOTHELINS AND ENDOTHELIAL FACTORS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HYPERTENSION; *J Hypertens*, **2005**, 23, 233-246
- Burns A., Byrne E.J., Maurer K.: ALZHEIMER'S DISEASE; *Lancet*, **2002**, 360, 163-165
- Bush A.I., Pettingell W.H., d. Paradis Jr. M., Tanzi R.E.: MODULATION OF A β ADHESIVENESS AND SECRETASE SITE CLEAVAGE BY ZINC; *J Biol Chem*, **1994**, 269, 12152-12158
- Bush A.I., Tanzi R.E.: THERAPEUTICS FOR ALZHEIMER'S DISEASE BASED ON THE METAL HYPOTHESIS; *Neurotherapeutics*, **2008**, 5, 421-432
- Butterfield D.A., Boyd-Kimball D.: AMYLOID β -PEPTIDE (1-42) CONTRIBUTES TO THE OXIDATIVE STRESS AND NEURODEGENERATION FOUND IN ALZHEIMER DISEASE BRAIN; *Brain Pathol*, **2004**, 14, 426-432
- Butterfield D.A.: AMYLOID β -PEPTIDE (1-42)-ASSOCIATED FREE RADICAL-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE BRAIN: MECHANISM AND CONSEQUENCES; *Curr Med Chem*, **2003**, 10, 2651-2659
- Buxbaum J., Geohagen N., Friedhoff L.: CHOLESTEROL DEPLETION WITH PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS OF A STATIN DECREASES THE FORMATION OF THE ALZHEIMER AMYLOID A β PEPTIDE; *J Alzheimers Dis*, **2001**, 3, 221-229
- Chang P.-T., Kung F.-L., Talekar R.S., Chen C.-S., Lai S.-Y., Lee H.-Y., Chern J.-W.: AN IMPROVED SCREENING MODEL TO IDENTIFY INHIBITORS TARGETING ZINC-ENHANCED AMYLOID AGGREGATION; *Anal Chem*, **2009**, 81, 6944-6951
- Cheng H., Schwartz M.S., Vickers S., Gilbert J.D., Amin R.D., Depuy B., Liu L., Rogers J.D., Pond S.M., Duncan C.A., Olah T.V., Bayne W.I.: METABOLIC DISPOSITION OF SIMVASTATIN IN PATIENTS WITH T-TUBE DRAINAGE; *Drug Metab Dispos*, **1994**, 22, 139-142
- Cherny R.A., Atwood C.S., Xilians M.E., Gray D.N., Jones W.D., McLean C.A., Barnham K.J., Volitakis I., Fraser F.W., Kim Y.-S., Huang X., Goldstein L.E., Moir R.D., Lim J.T., Beyreuther K., Zheng H., Tanzi R.E., Masters C.L., Bush A.I.: TREATMENT WITH A COPPER-ZINC CHELATOR MARKEDLY AND RAPIDLY INHIBITS BETA-AMYLOID ACCUMULATION IN ALZHEIMER'S DISEASE TRANSGENIC MICE; *Neuron*, **2001**, 30, 665-676
- Chirileanu R.D., Simu M., Reisz D., Males S., Tocai R., Albiei R.: RISK FACTORS IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Medicine in evolution*, **2004**, 4, 135-139
- Christensen D.D.: CHANGING THE COURSE OF ALZHEIMER'S DISEASE: ANTI-AMYLOID DISEASE-MODIFYING TREATMENTS ON THE HORIZON; *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, **2007**, 9, 32-41
- Christians U., Jacobsen W., Floren L.C.: METABOLISM AND DRUG INTERACTION OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS IN TRANSPLANT PATIENTS: ARE THE STATINS MECHANISTICALLY SIMILAR?; *Pharmacol Therapeut*, **1998**, 80, 1-34
- Citron M.: STRATEGIES FOR DISEASE MODIFICATION IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Nature*, **2004**, 5, 677-685
- Cohen L.H., Leeuwen R.E.W., van Thiel G.C.F., van Pelt J.F., Yap S.H.: EQUALLY POTENT INHIBITORS OF CHOLESTEROL SYNTHESIS IN HUMAN HEPATOCYTES HAVE DISTINGUISHABLE EFFECTS ON DIFFERENT CYTOCHROME P450 ENZYMES; *Biopharm Drug Dispos*, **2000**, 21, 353-364
- Cordy J., Hussain I., Dingwall C., Hooper N., Turner A.: EXCLUSIVELY TARGETING BETA-SECRETASE TO LIPID RAFTS BY GPI-ANCHOR ADDITION UPREGULATES BETA-SITE PROCESSING OF THE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, 100, 11735-11740
- Corsini A., Maggi F.M., Catapano A.L.: PHARMACOLOGY OF COMPETITIVE INHIBITORS OF HMG-CoA REDUCTASE; *Pharmacol Res*, **1995**, 31, 9-27
- Dabak K., Adiyaman M., PROCESS FOR THE PREPARATION OF SIMVASTATIN FROM LOVASTATIN; *Patent* **2003**, WO 2003000673

Dabak K., Adiyaman M.: A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF ANTIHYPERCHOLESTEROLEMIC AGENT SIMVASTATIN; *Hel Chim Acta*, **2003**, 86, 673-677

Dabora R.L., Tewalt G.L.: PROCESS TO SIMVASTATIN ESTER; *Patent* **1992**, US 5159104

Darvesh S., Hopkins D., Geula C.: NEUROBIOLOGY OF BUTYLCHOLINESTERASE; *Nat Rev Neurosci*, **2003**, 4, 131-138

Del Soldato P.: SYNTHESIS, ACTIVITY AND FORMULATIONS OF PHARMACEUTICAL COMPOUNDS FOR TREATMENT OF OXIDATIVE AND / OR ENDOTHELIAL DYSFUNCTION; *Patent* **2001**, WO 2001012584

Ditschuneit H.H., Kuhn K., Ditschuneit H.: COMPARISON OF DIFFERENT HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS; *Eur J Clin Pharmacol*, **1991**, 40, 27-32

Eliasson M.J.L., Huang Z., Ferrante R.J., Sasamata M.E., Molliver M.E., Snyder S.H., Moskowitz M.A.: NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVATION AND PEROXYNITRITE FORMATION IN ISCHEMIC STROKE LINKED TO NEURONAL DAMAGE; *J Neurosci*, **1999**, 19, 5910-5918

Endo A.: THE DISCOVERY AND DEVELOPMENT OF HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS; *J Lipid Res*, **1992**, 33, 1569-1582

Esch F.S., Keim P.S., Beattie E.C., Blacher R.W., Culwell A.R., Oltersdorf T., McClure D., Ward P.J.: CLEAVAGE OF AMYLOID BETA PEPTIDE DURING CONSTITUTIVE PROCESSING OF ITS PRECURSOR; *Science*, **1990**, 248, 1122-1124

Fang L., Appenroth D., Decker M., Kiehnopf M., Roegler C., Deufel T., Fleck C., Peng S., Zhang Y., Lehmann J.: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NO-DONOR-TACRINE HYBRIDS AS HEPATOPROTECTIVE ANTI-ALZHEIMER DRUG CANDIDATES; *J Med Chem*, **2008b**, 51, 713-716

Fang L., Lehmann J.: NO DONOR HYBRID COMPOUNDS AS MULTIFUNCTIONAL THERAPEUTIC AGENTS; *Expert Opin Ther Patents*, **2008a**, 18, 1111-1125

Fändrich M.: ABSOLUTE CORRELATION BETWEEN LAG TIME AND GROWTH RATE IN THE SPONTANEOUS FORMATION OF SEVERAL AMYLOID-LIKE AGGREGATES AND FIBRILS; *J Mol Biol*, **2007**, 365, 1266-1270

Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann D., Keller P., Runz H., Kuhls S., Bertsch T., von Bergmann K., Hennerici M., Beyreuther K., Hartmann T.: SIMVASTATIN STRONGLY REDUCES LEVELS OF ALZHEIMER'S DISEASE β -AMYLOID PEPTIDES A β 42 AND A β 40 IN VITRO AND IN VIVO; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**, 98, 5856-5861

Fillit H.M., O'Connell A.W., Refolo L.M.: STRATEGIES FOR DRUG DISCOVERY FOR COGNITIVE AGING AND ALZHEIMER'S DISEASE; *J Neurosci*, **2002**, 19, 1—3

Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R.: "MINI-MENTAL STATE" A PRACTICAL METHOD FOR GRADING THE COGNITIVE STATE OF PATIENTS FOR THE CLINICIAN; *J Psychiat Res*, **1975**, 12, 189-198

Frank B., Gupta S.: A REVIEW OF ANTIOXIDANTS AND ALZHEIMER'S DISEASE; *Ann Clin Psychiatry*, **2005**, 17, 269-286

Frears E., Stephens D., Walters C., Davies H., Austen B.: THE ROLE OF CHOLESTEROL IN THE BIOSYNTHESIS OF BETA-AMYLOID; *Neuroreport*, **1999**, 10, 1699-1705

Frimpong K., Rodwell V.: CATALYSIS BY SYRIAN HAMSTER 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE; *J Biol Chem*, **1994**, 269, 11478-11483

Galbete J., Rodriguez-Martin T., Peressini E., Modena P., Bianchi R., Forloni G.: CHOLESTEROL DECREASES SECRETION OF THE SECRETED FORM OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY INTERFERING WITH GLYCOSYLATION IN THE PROTEIN SECRETORY PATHWAY; *Biochem J*, **2000**, 348, 307-313

Gandy S.: NEUROHORMONAL SIGNALING PATHWAYS AND THE REGULATION OF ALZHEIMER β -AMYLOID PRECURSOR METABOLISM; *Trends Endocrin Met*, **1990**, 7, 273-279

Gellermann G.P., Ullrich K., Tannert A., Unger C., Habicht G., Sauter S.R.N., Hortschansky P., Horn U., Möllmann U., Decker M., Lehmann J., Fändrich M.: ALZHEIMER-LIKE PLAQUE FORMATION BY HUMAN MACROPHAGES IS REDUCED BY FIBRILLATION INHIBITORS AND LOVASTATIN; *J Biol Chem*, **2006**, 360, 251-257

- George A., Holsinger R., McLeab C., Laughton K., Beyreuther K., Evin G., Masters C., Li Q.: APP INTRACELLULAR DOMAIN IS INCREASED AND SOLUBLE A β IS REDUCED WITH DIET-INDUCED HYPERCHOLESTEROLEMIA IN A TRANSGENIC MOUSE MODEL OF ALZHEIMER DISEASE; *Neurobiol Dis*, **2004**, 16, 124-132
- Giner J.-L., Margot C., Djerassi C.: STEREOSPECIFICITY AND REGIOSPECIFICITY OF THE PHOSPHORUS OXYCHLORIDE DEHYDRATION OF STEROL SIDE CHAIN ALCOHOLS; *J Org Chem*, **1989**, 54, 369-373
- Goedert M., Jakes R.: MUTATIONS CAUSING NEURODEGENERATIVE TAUOPATHIES; *Biochim Biophys Acta*, **2005**, 1739, 240-250
- Golde T.E., Erikson J.L., Weggen S., Sagi S.A., Koo E.H.: NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS AS THERAPEUTIC AGENTS FOR ALZHEIMER'S DISEASE; *Drug Dev Res*, **2002**, 56, 415-420
- Golde T.E., Estus S., Younkin L.H., Selkoe D.J., Younkin S.G.: PROCESSING OF THE AMYLOID PRECURSOR TO POTENTIALLY AMYLOIDOGENIC DERIVATIVES; *Science*, **1992**, 255, 728-730
- Gouras G.K., Beal M.F.: METAL CHELATOR DECREASES ALZHEIMER β -AMYLOID PLAQUES; *Neuron*, **2001**, 30, 641-647
- Grimm M., Grimm H., Tomic I., Beyreuther K., Hartmann T., Bergmann C.: INDEPENDENT INHIBITION OF ALZHEIMER DISEASE BETA- AND GAMMA-SECRETASE CLEAVAGE BY LOWERED CHOLESTEROL LEVELS; *J Biol Chem*, **2008**, 283, 111302-11311
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S., Wisniewski H.M.: MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU. A COMPONENT OF ALZHEIMER PAIRED HELICAL FILAMENTS; *J Biol Chem*, **1986a**, 261, 6084-6089
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder L.I.: ABNORMAL PHOSPHORYLATION OF THE MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU (TAU) IN ALZHEIMER CYTOSKELETAL PATHOLOGY; *Proc Natl Acad Sci USA*, **1986b**, 83, 4913-4917
- Guengerich F.P.: CYTOCHROME P-450 3A4: REGULATION AND ROLE IN DRUG METABOLISM; *Annu Rev Pharmacol*, **1999**, 39, 1-17
- Hajjar L., Schumpert J., Hirth V., Wieland D., Eleazer G.P.: THE IMPACT OF THE USE ON THE PREVALENCE OF DEMENTIA AND THE PROGRESSION OF COGNITIVE IMPAIRMENT; *J Gerontol*, **2002**, 57A, M414-M418
- Hamaguchi T., Ono K., Yamada M.: ANTI-AMYLOIDOGENIC THERAPIES: STRATEGIES FOR PREVENTION AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE; *Cell Mol Life Sci*, **2006**, 63, 1538-1552
- Hardy J.A., Allsop D.: AMYLOID DEPOSITION AS THE CENTRAL EVENT IN THE AETIOLOGY OF ALZHEIMER'S DISEASE; *Trends Pharmacol Sci*, **1991**, 12, 383-388
- Hardy J.A., Higgins G.A.: ALZHEIMER'S DISEASE: THE AMYLOID CASCADE HYPOTHESIS; *Science*, **1992**, 256, 184-185
- Hardy J.A., Selkoe D.J.: THE AMYLOID HYPOTHESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE: PROGRESS AND PROBLEMS ON THE ROAD TO THERAPEUTICS; *Science*, **2002**, 297, 353-356
- Harper J.D., Lansbury P.T., Jr.: MODELS OF AMYLOID SEEDING IN ALZHEIMER'S DISEASE AND SCRAPIE: MECHANISTIC TRUTH AND PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES OF THE TIME-DEPENDENT SOLUBILITY OF AMYLOID PROTEINS; *Annu Rev Biochem*, **1997**, 66, 385-407
- Hasselmo M.E.: THE ROLE OF ACETYLCHOLINE IN LEARNING AND MEMORY; *Curr Opin Neurobiol*, **2006**, 16, 710-715
- Hensley K., Carbey J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., Floyd R.A., Butterfield D.A.: A MODEL FOR β -AMYLOID AGGREGATION AND NEUROTOXICITY BASED ON FREE RADICAL GENERATION BY THE PEPTIDE: RELEVANCE TO ALZHEIMER DISEASE; *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**, 91, 3270-3274
- Hess D.C., Demchuk A.M., Brass L.M., Yatsu F.M.: HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS (STATINS): A PROMISING APPROACH TO STROKE PREVENTION; *Neurology*, **2000**, 54, 790-796
- Höffler D., Lasek R., Berthold H.K.: THERAPIEEMPFEHLUNGEN DER ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN ÄRZTESCHAFT: DEMENZ; Berlin, 3. Auflage **2004**, <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/TE/Archiv/Demenz.pdf> (17.09.2010)

- Hoffman W.F., Alberts A.W., Anderson P.S., Chen J.S., Smith R.L., Willard A.K.: 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS. 4. SIDE CHAIN ESTER DERIVATIVES OF MEVINOLIN; *J Med Chem*, **1986**, 29, 849-852
- Hoffman W.F.: MONOCYCLIC LACTONE DERIVATIVES OF MEVINOLIN AND COMPACTIN AS HYDROXYMETHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS; *Patent* **1987**, US 4665091
- Hoffmann W.F., Smith R.L., Willard A.K.: ANTIHYPERCHOLESTEROLEMIC COMPOUNDS; *Patent* **1984**, US 4444784
- Hütter J., Noack E.: PREPARATION OF N-(HYDROXYALKANOYL)-L-METHIONE-CYSTEINE NITRATE DERIVATIVES FOR TREATMENT OF HEART DISEASE; *Patent* **1990**, EP 891167009
- Iqbal K., Alonso A. del C., Chen S., Chohan M.O., El-Akkad E., Gong C.-X., Khatoun S., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I.: TAU PATHOLOGY IN ALZHEIMER DISEASE AND OTHER TAUOPATHIES; *Biochim Biophys Acta*, **2005**, 1739, 198-210
- Iqbal K., Grundke-Iqbal I.: DEVELOPING PHARMACOLOGICAL THERAPIES FOR ALZHEIMER DISEASE; *Cell Mol Life Sci*, **2007**, 64, 2234-2244
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.: ENOTHELIUM-DERIVED RELAXING FACTOR PRODUCED AND RELEASED FROM ARTERY AND VEIN IS NITRIC OXIDE; *Proc Natl Acad Sci USA*, **1987**, 84, 9265-9269
- Ignarro L.J.: BIOLOGICAL ACTIONS AND PROPERTIES OF ENDOTHELIUM-DERIVED NITRIC OXIDE FORMED AND RELEASED FROM ARTERY AND VEIN; *Circ Res*, **1989**, 65, 1-21
- Jarvik G.P., Wijsman E.M., Kukull W.A., Schellenberg G.D., Yu C., Larson E.B.: INTERACTIONS OF APOLIPOPROTEIN E GENOTYPE, TOTAL CHOLESTEROL LEVEL, AGE, AND SEX IN PREDICTION ALZHEIMER'S DISEASE: A CASE-CONTROL STUDY; *Neurology*, **1995**, 45, 1092-1096
- Jicha G.A.: IS PASSIVE IMMUNIZATION FOR ALZHEIMER'S DISEASE 'ALIVE AND WELL' OR 'DEAD AND BURIED'?; *Expert Opin Biol Ther*, **2009**, 9, 481-491
- Jick H., Zornberg G.L., Jick S.S., Seshadri S., Drachman D.A.: STATINS AND THE RISK OF DEMENTIA; *Lancet*, **2000**, 356, 1627-1631
- Kabalka G.W., Varma M., Varma R.S.: TOSYLATION OF ALCOHOLS; *J Org Chem*, **1986**, 51, 2386-2388
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B.: THE PRECURSOR OF ALZHEIMER'S DISEASE AMYLOID A4 PROTEIN RESEMBLES A CELL SURFACE RECEPTOR; *Nature*, **1987**, 325, 733-736
- Kandiah N., Feldman H.H.: THERAPEUTIC POTENTIAL OF STATINS IN ALZHEIMER'S DISEASE; *J Neurol Sci*, **2009**, 283, 230-234
- Karkos J.: IMMUNOTHERAPIE DER ALZHEIMER-KRANKHEIT: EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE UND BEHANDLUNGSPERSPEKTIVEN; *Fortschr Neurol Psyc*, **2004**, 72, 204-219
- Kaufman F., Cook H.J., Davis S.M.: THE ELECTROLYTIC REDUCTION OF SIMPLE NITRATE ESTERS; *J Am Chem Soc*, **1952**, 74, 4997-5001
- Keeble J.E., Moore P.K.: PHARMACOLOGY AND POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATION OF NITRIC OXIDE-RELEASING NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY AND RELATED NITRIC OXIDE DONATING DRUGS; *Br J Pharmacol*, **2002**, 137, 295-310
- Kim J.W., Tae W., Park E.S., Cho D.O., Baek H.G.: CRYSTALLIZATION METHOD FOR PURIFYING CRUDE SIMVASTATIN; *Patent* **2003**, WO 2003066619
- Kojro E., Gimpl G., Lammich S., Marz W., Fahrenholz F.: LOW CHOLESTEROL STIMULATES THE NONAMYLOIDOGENIC PATHWAY BY ITS EFFECT ON THE α -SECRETASE ADAM 10; *Proc Natl Acad Sci*, **2001**, 98, 5815-5820
- Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J.: MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU (TAU) IS A MAJOR ANTIGENIC COMPONENT OF PAIRED HELICAL FILAMENTS IN ALZHEIMER DISEASE; *Proc Natl Acad Sci USA*, **1986**, 83, 4044-4048

- Krebs M.R.H., Bromley E.H.C., Donald A.M.: THE BINDING OF THIOVLAVIN-T TO AMYLOID FIBRILS: LOCALISATION AND IMPLICATIONS; *J Struct Biol*, **2005**, 149, 30-37
- Kubela R., Radhakrishnan J.: PROCESS FOR PRODUCING SIMVASTATIN AND ANALOGS THEREOF; *Patent* **1995**, US 5393893
- LaFerla F.M.: CALCIUM DISHOMEOSTASIS AND INTRACELLULAR SIGNALLING IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Nature*, **2002**, 3, 862-872
- Laufs U., Liao J.K.: TARGETING RHO IN CARDIOVASCULAR DISEASE; *Circ Res*, **2000**, 87, 526-528
- Lee S.-H., Lee K.-H., Choi K.-D., Lim J.-W., Kim J.-W.: METHOD OF PREPARING STATIN INTERMEDIATES; *Patent* **2004**, WO 2004096789
- Lemere C.A., Masliah E.: CAN ALZHEIMER DISEASE BE PREVENTED BY AMYLOID- β IMMUNOTHERAPY?; *Nat Rev Neurol*, **2010**, 6, 108-119
- Lindwall G., Cole R.D.: PHOSPHORYLATION AFFECTS THE ABILITY OF TAU PROTEIN TO PROMOTE MICROTUBULE ASSEMBLY; *J Biol Chem*, **1984**, 259, 5301-5305
- Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H., Lei S.Z., Chen H.S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J., Stamler J.S.: A REDOX-BASED MECHANISM FOR THE NEUROPROTECTIVE AND NEURODESTRUCTIVE EFFECTS OF NITRIC OXIDE AND RELATED NITROSO-COMPOUNDS; *Nature*, **1993**, 364, 626-632
- Lleó A., Greenberg S.M., Growdon J.H.: CURRENT PHARMACOTHERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE; *Annu Rev Med*, **2006**, 57, 513-533
- Lleó A.: CURRENT THERAPEUTIC OPTIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE; *Curr Genomics*, **2007**, 8, 550-558
- Loeb M.B., Molloy D.W., Smieja M., Standish T., Goldsmith C.H., Mahony J., Smith S., Borrie M., Decoteau E., Davidson W., McDougall A., Gnarp J., O'Donnell M., Chernesky M.: A RANDOMIZED, CONTROLLED TRIAL OF DOXYCYCLINE AND RIFAMPIN FOR PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE; *J Am Geriatr Soc*, **2004**, 52, 381-387
- Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R.: COPPER, IRON AND ZINC IN ALZHEIMER'S DISEASE SENILE PLAQUES; *J Neurol Sci*, **1998**, 158, 47-52
- Lu Y.F., Kandel E.R., Hawkins R.D.: NITRIC OXIDE SIGNALLING CONTRIBUTES TO LATE-PHASE LTP AND CREB PHOSPHORYLATION IN THE HIPPOCAMPUS; *J Neurosci*, **1999**, 19, 10250-10261
- Luo W., Li Y.-P., Gu L.-Q., Huang Z.-S.: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL BIS-AROMATIC METHYLENEDIOXY COMPOUNDS AS DIFUNCTIONAL ANTI-ALZHEIMER DISEASE AGENTS; *J Enzym Inhib Med Chem*, **2010** in press
- Malenovic A., Medenica M., Ivanovic D., Jancic B.: MONITORING OF SIMVASTATIN IMPURITIES BY HPLC WITH MICROEMULSION ELUENTS; *Chromatographia*, **2006**, 63, 95-100
- Melnikova I.: THERAPIES FOR ALZHEIMER'S DISEASE; *Nat Rev Drug Discov*, **2007**, 6, 241-242
- Merlini G., Bellotti V.: MOLECULAR MECHANISM OF AMYLOIDOSIS; *New Engl J Med*, **2003**, 349, 583-596
- Michaelis E.K.: MOLECULAR BIOLOGY OF GLUTAMATE RECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND THEIR ROLE IN EXCITOTOXICITY, OXIDATIVE STRESS AND AGING; *Prog Neurobiol*, **1998**, 54, 369-415
- Miller L., Chacko R.: THE ROLE OF CHOLESTEROL AND STATINS IN ALZHEIMER'S DISEASE, *Ann Pharmacother*, **2004**, 38, 91-98
- Mills J., Reiner P.B.: REGULATION OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN CLEAVAGE; *J Neurochem*, **1999**, 72, 443-460
- Moghadasian M.H.: CLINICAL PHARMACOLOGY OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS; *Life Sci*, **1999**, 65, 1329-1337
- Morgan B., Burk M., Levin M., Zhu Z., Chaplin J., Kustedjo K., Huang Z., Greenberg W.: METHODS FOR MAKING SIMVASTATIN AND INTERMEDIATES FROM LOVASTATIN; *Patent* **2005**, WO 2005040107
- Nermut M.V.: METHODEN DER NEGATIV-KONTRASTIERUNG; In: Schimmel G., Vogel W. (ed): Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. Stuttgart: Wiss. Verlag, **1973**, 1-18

- Notkola I.-L., Sulkava R., Pekkanen J., Erkinjuntti T., Ehnholm C., Kivinen P., Tuomilehto J., Nissinen A.: SERUM TOTAL CHOLESTEROL, APOLIPOPROTEIN E ϵ 4 ALLELE, AND ALZHEIMER'S DISEASE; *Neuroepidemiology*, **1998**, 17, 14-20
- O'Sullivan S., O'Neill J.: A PROCESS FOR PREPARING ATORVASTATIN LACTON; *Patent* **2007**, IE 20050594
- Oh D.-J., Lee B.-C.: SOLUBILITY OF SIMVASTATIN AND LOVASTATIN IN MIXTURES OF DICHLORMETHANE AND SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE; *J Chem Eng Data*, **2007**, 52, 1273-1279
- Ono K., Hasegawa K., Yamada M., Naiki H.: NICOTINE BREAKS DOWN PREFORMED ALZHEIMER'S β -AMYLOID FIBRILS IN VITRO; *Biol Psychiatry*, **2002**, 52, 880-886
- Ono K., Yoshiike Y., Takashima A., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M.: POTENT ANTI-AMYLOIDOGENIC AND FIBRIL-DESTABILIZING EFFECTS OF POLYPHENOLS IN VITRO: IMPLICATIONS FOR THE PREVENTION AND THERAPEUTICS OF ALZHEIMER'S DISEASE; *J Neurochem*, **2003**, 87, 182-181
- Ostrowski S.M., Wilkinson B.L., Golde T.E., Landreth G.: STATINS REDUCE AMYLOID- β PRODUCTION THROUGH INHIBITION OF PROTEIN ISOPRENYLATION; *J Biol Chem*, **2007**, 282, 26832-26844
- Paglini G., Peris L., Mascotti F., Quiroga S., Caceres A.: TAU PROTEIN FUNCTION IN AXONAL FORMATION; *Neurochem Res*, **2000**, 25, 37-42
- Parson R.B., Farrant J.K., Price G.C., Subramaniam D., Austen B.M.: REGULATION OF THE LIPIDATION OF β -SECRETASE BY STATINS; *Biochem Soc T*, **2007**, 35, 577-582
- Parson R.B., Price G.C., Farrant J.K., Subramaniam D., Adeagbo-Sheikh J., Austen B.M.: STATINS INHIBIT THE DIMERIZATION OF β -SECRETASE VIA BOTH ISOPRENOID-AND CHOLESTEROL-MEDIATED MECHANISMS; *Biochem J*, **2006**, 399, 205-214
- Petanceska S., De Rosa S., Olm V., Diaz N., Sharma A., Thomas-Bryant T., Duff K., Pappolla M., Refolo L.: STATIN THERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE: WILL IT WORK?; *J Mol Neurosci*, **2002**, 19, 155-161
- Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P., Gauthier S.: APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM AND ALZHEIMER'S DISEASE; *Lancet*, **1993**, 342, 697-699
- Postina R.: A CLOSER LOOK AT α -SECRETASE; *Curr Alzheimer Res*, **2008**, 5, 179-186
- Rafii M.S., Aisen P.S.: RECENT DEVELOPMENT IN ALZHEIMER'S DISEASE THERAPEUTICS; *BMC Med*, **2009**, 7:7, <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1741-7015-7-7.pdf>
- Regland B., Lehmann W., Abedini I., Blennow K., Jonsson M., Karlsson I., Sjögren M., Wallin A., Xilinas M., Gottfries C.G.: TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE WITH CLIOQUINOL; *Dement Geriatr Cogn Disord*, **2001**, 12, 408-414
- Reid P.C., Urano Y., Kodama T., Hamakubo T.: ALZHEIMER'S DISEASE: CHOLESTEROL, MEMBRANE RAFTS, ISOPRENOIDS AND STATINS; *J Cell Mol Med*, **2007**, 11, 383-392
- Reisberg B., Doody R., Stoffer A., Schmitt F., Ferris S., Mobius H.J.: MEMANTINE IN MODERATE-TO-SEVERE ALZHEIMER'S DISEASE; *New Engl J Med*, **2003**, 348, 1333-1341
- Reiss A.B.: CHOLESTEROL AND APOLIPOPROTEIN E IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, **2005**, 20, 91-96
- Ren S., McNamara P., Koharski D., Hesk D., Borges S.: DESIGN AND SYNTHESIS OF SULFUR-35 AGENTS AND THEIR APPLICATIONS FOR PROTEIN LABELING; *J Label Compd Radiopharm*, **2009**, 52, 316-323
- Ritchie C.W., Bush A.I., Mackinnon A., Macfarlane S., Mastwyk M., MacGregor L., Kiers L., Cherny R., Li Q.-X., Tammer A., Carrington D., Mavros C., Volitakis I., Xilinas M., Ames D., Davis S., Beyreuther K., Tanzi R.E., Masters C.L.: METAL-PROTEIN ATTENUATION WITH IODOCHLORHYDROXYQHIN (CLIOQUINOL) TARGETING A β AMYLOID DEPOSITION AND TOXICITY IN ALZHEIMER DISEASE; *Arch Neurol*, **2003**, 60, 1685-1691
- Ritter C.A., Kroemer H.K.: INTERAKTIONEN-UND NEBENWIRKUNGSPOTENTIAL DER STATINE; *Pharm Unserer Zeit*, **2003**, 6, 490-497
- Robinson D.M., Keating G.M.: MEMANTINE. A REVIEW OF ITS USE IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Drugs*, **2006**, 66, 1515-1534

- Rochet J.-C., Lansbury Jr. P.T.: AMYLOID FIBRILLOGENESIS: THEMES AND VARIATIONS; *Curr Opin Struct Biol*, **2000**, 10, 60-68
- Rosen W.G., Mohs R.C., Davis K.L.: A NEW RATING SCALE FOR ALZHEIMER'S DISEASE; *Am J Psychiat*, **1984**, 141, 1356-1364
- Rosini M., Simoni E., Bartolini M., Cavalli A., Ceccarini L., Pascu N., McClymont D.W., Tarozzi A., Bolognesi M.L., Minarini A., Tumiatti V., Andrisano V., Mellor I.R., Melchiorre C.: INHIBITION OF ACETYLCHOLINESTERASE, β -AMYLOID AGGREGATION, AND NMDA RECEPTORS IN ALZHEIMER'S DISEASE: A PROMISING DIRECTION FOR THE MULTI-TARGET-DIRECTED LIGANDS GOLD RUSH; *J Med Chem*, **2008**, 51, 4381-4384
- Roth B.D., Bocan T.M.A., Blankley C.J., Chucholowski A.W., Creger P.L., Creswell M.W., Ferguson E., Newton R.S., O'Brien P., Picard J.A., Roark W.H., Sekerke C.S., Sliskovic D.R., Wilson M.W.: RELATIONSHIP BETWEEN TISSUE SELECTIVITY AND LIPOPHILICITY FOR INHIBITORS OF HMG-CoA REDUCTASE; *J Med Chem*, **1991**, 34, 463-466
- Roth G.J., Heckel A., Colbatzky F., Handschuh S., Kley J., Lehmann-Lintz T., Lotz R., Tontsch-Grunt U., Walter R., Hilberg F.: DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF INDOLINONES AS TRIPLE ANGIOKINASE INHIBITORS AND THE DISCOVERY OF A HIGHLY SPECIFIC 6-METHOXYCARBONYL-SUBSTITUTED INDOLINONE (BIBF 1120); *J Med Chem*, **2009**, 52, 4466-4480
- Salomon A.R., Marcinowski J., Friedland R.P., Zagorski M.G.: NICOTINE INHIBITS AMYLOID FORMATION BY THE β -PEPTIDE; *Biochemistry*, **1996**, 35, 13568-13578
- Sambasivan G.: PROCESS FOR MANUFACTURING SIMVASTATIN AND ITS NOVEL INTERMEDIATES STARTING FROM LOVASTATIN; *Patent* **2002**, WO 2002024675
- Sankaranarayanan S., Price E.A., Wu G., Crouthamel M.-C., Shi X.-P., Tugusheva K., Tyler K.X., Khana J., Ellis J., Jin L., Steele T., Stachel S., Coburn C., Simon A.J.: IN VIVO β -SECRETASE 1 INHIBITION LEADS TO BRAIN A β LOWERING AND INCREASED α -SECRETASE PROCESSING OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN WITHOUT EFFECT ON NEUREGULIN-1; *J Pharmacol Exp Ther*, **2008**, 324, 957-969
- Santa-Maria I., Hernández F., Del Rio J., Moreno F.J., Avila J.: TRAMIPROSATE, A DRUG OF POTENTIAL INTEREST FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE, PROMOTES AN ABNORMAL AGGREGATION OF TAU; *Mol Neurodegener*, **2007**, 2, 17-28
- Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandever C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P.: IMMUNIZATION WITH AMYLOID-BETA ATTENUATES ALZHEIMER-DISEASE-LIKE PATHOLOGY IN THE PDAPP MOUSE; *Nature*, **1999**, 40, 173-177
- Schenk D.: AMYLOID-BETA IMMUNOTHERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE: THE END OF THE BEGINNING; *Nat Rev Neurosci*, **2002**, 3, 824-828
- Schmechel A., Strauss M., Schlicksupp A., Pipkorn R., Haass C., Bayer T.A., Multhaup G.: HUMAN BACE FORMS DIMERS AND COLOCALIZES WITH APP; *J Biol Chem*, **2004**, 279, 39710-39717
- Schmechel A., Zentgraf H., Scheuermann S., Fritz G., Pipkorn R., Reed J., Beyreuther K., Bayer T.A., Multhaup G.: ALZHEIMER β -AMYLOID HOMODIMERS FACILITATE A BETA FIBRILLIZATION AND THE GENERATION OF CONFORMATIONAL ANTIBODIES; *J Biol Chem*, **2003**, 278, 35317-35324
- Schneider A., Mandelkow E.: TAU-BASED TREATMENT STRATEGIES IN NEURODEGENERATIVE DISEASES; *J Am Soc Exp*, **2008**, 5, 443-457
- Schultz R.R., Siviero M.O., Bertolucci P.H.F.: THE COGNITIVE SUBSCALE OF THE "ALZHEIMER'S DISEASE ASSESSMENT SCALE" IN A BRAZILIAN SAMPLE; *Braz J Med Biol Res*, **2001**, 34, 1295-1302
- Selkoe D.J.: AMYLOID β -PROTEIN AND THE GENETICS OF ALZHEIMER'S DISEASE; *J Biol Chem*, **1996**, 271, 18295-18298
- Shobab L., Hsiung G.-Y.R., Feldman H.H.: CHOLESTEROL IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Neurology*, **2005**, 4, 841-852
- Simons K., Ikonen E.: HOW CELLS HANDLE CHOLESTEROL; *Science*, **2000**, 290, 1721-1725
- Sisodia S.S., George-Hyslop P.H.: γ -SECRETASE, NOTCH, A β AND ALZHEIMER'S DISEASE: WHERE DO THE PRESENILINS FIT IN?; *Nat Rev Neurosci*, **2002**, 3, 281-290

- Sjögren M., Mielke M., Gustafson D., Zandi P., Skoog I.: CHOLESTEROL AND ALZHEIMERS'S DISEASE-IS THERE A RELATION?; *Mech Ageing Dev*, **2006**, 127, 138-147
- Sletzing M., Verhoeven T.R., Volante R.P.: C-METHYLATION OF 2-METHYLBUTYRATE MOIETY OF MEVINOLIN AND COMPACTIN DERIVATIVES; *Patent* **1985**, EP 137445
- Son H., Lu Y.F., Zhuo M., Arancio O., Kandel E.R., Hawkins R.D.: THE SPECIFIC ROLE OF cGMP IN HIPPOCAMPAL LTP; *Learn Memory*, **1998**, 5, 231-245
- Sparks D., Kuo Y., Roher A., Martin T., Lukas R.: ALTERATIONS OF ALZHEIMER'S DISEASE IN THE CHOLESTEROL-FED RABBIT, INCLUDING VASCULAR INFLAMMATION. PRELIMINARY OBSERVATIONS; *Ann NY Acad Sci*, **2000**, 903, 335-344
- Sparks D., Scheff S., Hunsaker J., Liu H., Landers T., Gross D.: INDUCTION OF ALZHEIMER-LIKE β -AMYLOID IMMUNOREACTIVITY IN THE BRAINS OF RABBITS WITH DIETARY CHOLESTEROL; *Exp Neurol*, **1994**, 126, 88-94
- Sparks D.L., Hunsaker III J.C., Scheff S.W., Kryscio R.J., Henson J.L., Markesbery W.R.: CORTICAL SENILE PLAQUES IN CORONARY ARTERY DISEASE, AGING AND ALZHEIMER'S DISEASE; *Neurobiol Aging*, **1990**, 11, 601-607
- Sparks D.L., Sabbagh M.N., Connor D.J., Lopez J., Launer L.J., Browne P., Wasser D., Johnson-Traver S., Lochhead J., Ziolkowski C.: ATORVASTATIN FOR THE TREATMENT OF MILD TO MODERATE ALZHEIMER DISEASE; *Arch Neurol*, **2002**, 62, 753-757
- St. George-Hyslop P.H.: HILFE BEI ALZHEIMER?; *Spektrum der Wissenschaft*, **2001**, 3, 45-51
- Staab H.A., Mannschreck A.: SYNTHESIS OF THE CARBOXYLIC ACID ESTERS BY THE IMIDAZOLIDE METHOD; *Chem Ber*, **1962**, 95, 1284-1297
- Stancu C., Sima A.: STATINS: MECHANISM OF ACTION AND EFFECTS; *J Cell Mol Med*, **2001**, 5, 378-387
- Stark H.: MEDIZINISCH-CHEMISCHE ASPEKTE VON STATINEN; *Pharm Unserer Zeit*, **2003**, 6, 464-469
- Stark H.: WIRKMECHANISMUS VON HMG-CoA-REDUKTASE-INHIBITOREN MEDIZINISCH-CHEMISCHE ASPEKTE VON STATINEN; *Pharm Unserer Zeit*, **2003**, 6, 464-470
- Stine W.B., Dahlgren K.N., Krafft G.A., LaDu M.J.: IN VITRO CHARACTERIZATION OF CONDITIONS FOR AMYLOID- β PEPTIDE OLIGOMERIZATION AND FIBRILLOGENESIS; *J Biol Chem*, **2003**, 278, 11612-11622
- Stokker G.E., Rooney C.S., Wiggins J.M., Hirshfield J.: SYNTHESIS AND X-RAY CHARACTERISATION OF 6(S)-EPI-MEVINOLIN, A LACTONE EPIMER; *J Org Chem*, **1986**, 51, 4931-4934
- Stozicka Z., Zilka N., Novak M.: RISK AND PROTECTIVE FACTORS FOR SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE; *Acta Virol*, **2007**, 51, 205-222
- Stroit A., Hein K.A.C., Kruse C.G., Terwel L.J.H.: PREPARATION OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS WITH AFFINITY TO MUSCARINIC RECEPTORS; *Patent* **2008**, WO 2008129054
- Thatcher G.R.J., Bennett B.M., Reynolds J.N.: NITRIC OXIDE MIMETIC MOLECULES AS THERAPEUTIC AGENTS IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Curr Alzheimer Res*, **2005**, 2, 171-182
- Thatcher G.R.J., Bennett B.M., Reynolds J.N.: NO CHIMERAS AS THERAPEUTIC AGENTS IN ALZHEIMER'S DISEASE; *Curr Alzheimer Res*, **2006**, 3, 237-245
- Tomiyama T., Asano S., Suwa Y., Morita T., Kataoka K., Mori H., Endo N.: RIFAMPICIN PREVENTS THE AGGREGATION AND NEUROTOXICITY OF AMYLOID β PROTEIN IN VITRO; *Biochem Bioph Res Co*, **1994**, 204, 76-83
- Tomiyama T., Shoji A., Kataoka K., Suwa Y., Asano S., Kaneko H., Endo N.: INHIBITION OF AMYLOID β PROTEIN AGGREGATION AND NEUROTOXICITY BY RIFAMPICIN; *J Biol Chem*, **1996**, 271, 6839-6844
- Trochu J.-N., Mital S., Zhang X., Xu X., Ochao M., Liao J.K., Recchia F.A., Hintze T.H.: PRESERVATION OF NO PRODUCTION BY STATINS IN THE TREATMENT OF HEART FAILURE; *Cardiovasc Res*, **2003**, 60, 250-258
- Turconi F.: 4-METHYL-5-(2-AMINOETHYL) THIOMETHYLIMIDAZOLE DERIVATIVES HAVING THERAPEUTIC ACTIVITY; *Patent* **1981**, EP 0036684

- Upadhyaya P., Seth V., Ahmad M.: THERAPY OF ALZHEIMER'S DISEASE: AN UPDATE; *Afr J Pharm Pharmacol*, **2010**, 4, 408-421
- Van Dalen F., Lemmens J.M., Van Helvoirt G.A.P., Peters T.H.A., Picha A.: PROCESS FOR PRODUCING SIMVASTATIN AND ITS DERIVATIVES; *Patent* **1999**, WO 9945003
- Van Vliet A.K., Nègre-Aminou P., van Thiel G.C.F., Bolhuis P.A., Cohen L.H.: ACTION OF LOVASTATIN, SIMVASTATIN, AND PRAVASTATIN ON STEROL SYNTHESIS AND THEIR ANTIPROLIFERATIVE EFFECT IN CULTURED MYOBLASTS FROM HUMAN STRIATED MUSCLE; *Biochem Pharmacol*, **1996**, 52, 1387-1392
- Van Vliet A.K., Van Thiel G.C.F., Huisman R.H., Moshage H., Yap S.H., Cohen L.H.: DIFFERENT EFFECTS OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS ON STEROL SYNTHESIS IN VARIOUS HUMAN CELL TYPES; *Biochim Biophys Acta*, **1995**, 1254, 105-111
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M.: β -SECRETASE CLEAVAGE OF ALZHEIMER'S AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY THE TRANSMEMBRANE ASPARTIC PROTEASE BACE; *Science*, **1999**, 286, 735-740
- Verhoeven T.R., Askin D., PREPARATION OF LOVASTATIN DERIVATIVES AS INTERMEDIATES FOR HMG-CoA-REDUCTASE INHIBITORS; *Patent* **1989**, EP 299656
- Vickers S., Duncan C.A.: STUDIES ON THE METABOLIC INVERSION OF THE 6'CHIRAL CENTER OF SIMVASTATIN; *Biochem Bioph Res Co*, **1991**, 181, 1508-1515
- Vyas K.P., Kari P.H., Pitzenberger S.M., Halpin R.A., Ramjit H.G., Arison B., Murphy J.S., Hoffmann W.F., Schwartz M.S., Ulm E.H., Duggan D.E.: BIOTRANSFORMATION OF LOVASTATIN. I. STRUCTURE ELUCIDATION OF IN VITRO AND IN VIVO METABOLITES IN RAT AND MOUSE; *Drug Metab Dispos*, **1990**, 18, 203-211
- Wahrle S., Das P., Nyborg A., McLendon C., Shoji M., Kawarabayashi T., Younkin L., Younkin S., Golde T.: CHOLESTEROL-DEPENDENT GAMMA-SECRETASE ACTIVITY IN BUOYANT CHOLESTEROL-RICH MEMBRANE MICRODOMAINS; *Neurobiol Dis*, **2002**, 9, 11-23
- Wang R.W., Kari P.H., Lu A.Y.H., Thomas P.E., Guengerich F.P., Vyas K.P.: BIOTRANSFORMATION OF LOVASTATIN IV. IDENTIFICATION OF CYTOCHROME P450 3A PROTEINS AS MAJOR ENZYMES RESPONSIBLE FOR OXIDATIVE METABOLISM OF LOVASTATIN IN RAT AND HUMAN LIVER MICROSOMES; *Arch Biochem Biophys*, **1991**, 290, 355-361
- Wang X., Robinson P.J.: CYCLIC GMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE AND CELLULAR SIGNALLING IN THE NERVOUS SYSTEM; *J Neurochem*, **1997**, 68, 443-456
- Westmeyer G.G., Willem M., Lichtenthaler S.F., Lurman G., Multhaup G., Assfalg-Machleidt I., Reiss K., Saftig P., Haass C.: DIMERIZATION OF β -SITE β -AMYLOID PRECURSOR PROTEIN-CLEAVING ENZYME; *J Biol Chem*, **2004**, 279, 53205-53212
- Wiberg K.B., Laidig K.E.: ACIDITY OF (Z)-AND (E)-METHYL ACETATES: RELATIONSHIP TO MELDRUM'S ACID; *J Am Chem Soc*, **1988**, 110, 1872-1874
- Wilcock G.K., Black S.E., Hendrix S.B., Zavitz K.H., Swabb E.A., Laughlin M.A.: EFFICACY AND SAFETY OF TARENFLURBIL IN MILD TO MODERATE ALZHEIMER'S DISEASE: A RANDOMISED PHASE II TRIAL; *Lancet Neurol*, **2008**, 7, 483-493
- Willard A.K., Smith R.L.: INCORPORATION OF 2(S)-METHYLBUTANOIC ACID-1-¹⁴C INTO THE STRUCTURE OF MEVINOLIN; *J Labelled Comp Rad*, **1982**, 19, 337-344
- Wimo A., Winblad B., Jönsson L.: THE WORLDWIDE SOCIETAL COSTS OF DEMENTIA: ESTIMATES FOR 2009; *Alzheimer's&Dementia*, **2010**, 6, 98-103
- Wolfe M.S.: INHIBITION AND MODULATION OF GAMMA-SECRETASE FOR ALZHEIMER'S DISEASE; *Neurotherapeutics*, **2008**, 5, 391-398
- Wolfe M.S.: MEDIKAMENTE GEGEN DEN HIRNVERFALL; *Spektrum der Wissenschaft*, **2006**, 28-35
- Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G.G., Siegel G.: DECREASED PREVALENCE OF ALZHEIMER DISEASE ASSOCIATED WITH 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS; *Arch Neurol*, **2000**, 57, 1439-1443

Wolozin B.: A FLUID CONNECTION: CHOLESTEROL AND A β ; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**, 98, 5371-5373

Xu Y., Shen J., Luo X., Zhu W., Chen K., Ma J., Jiang H.: CONFORMATIONAL TRANSITION OF AMYLOID β -PEPTIDE; *PNAS*, **2005**, 102, 5403-5407

Yaffe K., Barrett-Connor B., Lin F., Grady D.: SERUM LIPOPROTEIN LEVELS, STATIN USE, AND COGNITIVE FUNCTION IN OLDER WOMEN; *Arch Neurol*, **2002**, 59, 378-384

Internetquellen

Intq I http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01_10.pdf
(14.07.2010)

Intq II <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport-ExecutiveSummary.pdf>
(15.08.2010)

Intq III www.alzheimers.org (05.04.2010)

Intq IV http://singularityhub.com/wp-content/uploads/2010/08/Alzheimers_BrainTree_medium.jpg
(18.11.2010)

Intq V <http://www.jci.org/articles/view/17527/files/JCI0317527.f2/medium> (16.09.2010)

Intq VI <http://www.medizininfo.de/kopfundseele/alzheimer/images/memantine.gif> (23.07.2010)

Intq VII <http://www.arzneistoffe.net/images/Statin-Wirkung.jpg> (17.10.2010)

Lebenslauf

Claudia Lengfelder

Geburtsdatum: 28. November 1982
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1987-1990 Volksschule München, München
1990-1992 Grundschule Bad Mergentheim, Bad Mergentheim
1992-1993 Grundschule an der Bäke, Berlin
1993-2002 Canisius-Kolleg (Gymnasium), Berlin
Juni 2002 Abitur
1999-2000 Delburne High School, Alberta (Kanada)

Hochschulausbildung

2003-2006 Chemie, Freie Universität Berlin
Juli 2006 Bachelor of Science
2006-2007 Drug Chemistry, Newcastle University
Juli 2007 Master of Science

Praktische Ausbildung

März 2004-Mai 2004 Wacker, Consortium für elektrochemische Industrie, München
(Chemiepraktikum)

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit Oktober 2007 Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Institut für Pharmazeutische/Medizinische Chemie
der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist,

dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Literatur angefertigt habe,

dass ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe, noch Dritte unmittelbar noch mittelbar Leistungen in Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation von mir erhalten haben und

dass ich die vorliegende Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung und keine weitere Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Jena, im Dezember 2010